



Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Dottorato in Biologia Applicata

XXIV° Ciclo

TESI DI DOTTORATO

IN

ECOLOGIA

***Attività e struttura delle comunità microbiche del suolo di
leccete mediterranee. Effetti della deposizione di metalli in
traccia e IPA***

COORDINATORE

Ch.mo Prof. *Ezio Ricca*

TUTOR

Ch.ma Prof. *Anna Alfani*

CANDIDATA

Dott.ssa *Ludovica Sessa*

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

A Sabatino....Ti Amo

Il lavoro sperimentale oggetto di questa tesi è stato condotto sotto la guida delle
Dott.sse Baldantoni Daniela, De Nicola Flavia, Iovieno Paola

INDICE

Premessa	pag. 6
INTRODUZIONE	
La “qualità del suolo”: una problematica complessa	pag. 7
- Sostanza organica	pag. 10
- pH	pag. 11
- Nutrienti	pag. 12
- Acqua	pag. 13
- La comunità microbica del suolo	pag. 14
 Inquinamento del suolo	pag. 17
- Elementi in traccia	pag. 19
- Idrocarburi Policiclici Aromatici	pag. 23
 Il biomonitoraggio	pag. 29
 Obiettivo del lavoro	pag . 33
 MATERIALI E METODI	
Aree di studio	pag. 35
- Parco di Capodimonte (NA)	pag. 35
- Cratere degli Astroni (NA)	pag. 36
- Ottati (SA)	pag. 37
- Parco di Villa Patrizia (SI)	pag. 38
- Belcaro (SI)	pag. 38
- Cala Violina (GR)	pag. 39
 Differenze climatiche	pag. 40
 Il leccio	pag. 41
 Campionamenti di foglie e suolo	pag. 42

Trattamento dei campioni di foglie e analisi di laboratorio	pag. 43
- Determinazione della concentrazione di nutrienti ed elementi in traccia	pag. 43
- Determinazione della concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici	pag. 44
Trattamento dei campioni di suolo e analisi di laboratorio	pag. 46
Caratterizzazione dei parametri chimico-fisici	pag. 46
- Tenore idrico, CIM, sostanza organica e pH	pag. 46
- Concentrazione totale e frazione disponibile di nutrienti ed elementi in traccia	pag. 47
- Concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici	pag. 47
Parametri biologici: significato ecologico e metodi analitici	pag. 48
- Biomassa microbica	pag. 48
- Ergosterolo	pag. 50
- Attività idrolasica totale	pag. 51
- Attività β -glucosidasica	pag. 52
- Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA)	pag. 43
- Profilo di risposta catabolica	pag. 55
Analisi statistica dei dati	pag. 58
RISULTATI E DISCUSSIONE	
Gradienti di contaminazione definiti mediante analisi delle foglie di leccio	pag. 59
- Concentrazione di elementi	pag. 59
- Concentrazione di IPA	pag. 64
- Analisi multivariata	pag. 67
Descrizione delle carote di suolo	pag. 69
Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli studiati	pag. 74
- Sostanza organica, CIM e pH	pag. 74
- Concentrazione totale e frazione disponibile di nutrienti ed elementi in traccia	pag. 76
- Na, K, Mg, Ca	pag. 76

- Fe, Mn, Zn, Cu	pag. 77
- Ni, Pb, Cr, Cd	pag. 78
- Concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici	pag. 87
Relazioni pianta-suolo	pag. 91
Indicatori biologici	pag. 95
- Biomassa microbica	pag. 95
- Ergosterolo	pag. 96
- Attività enzimatiche	pag. 98
- Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi	pag. 102
- Profilo di risposta catabolica	pag. 106
Visione sinottica dei risultati	pag. 112
CONCLUSIONI	pag. 116
RINGRAZIAMENTI	pag. 117
BIBLIOGRAFIA	pag. 118

PREMESSA

I cambiamenti socio-economici e tecnico-scientifici degli ultimi secoli hanno fortemente influenzato il rapporto tra uomo e ambiente. Se da un lato si osserva un miglioramento delle condizioni di vita, dall'altro si deve considerare che il progresso ha portato ad un peggioramento della qualità ambientale. Soprattutto nelle grandi città, gli insediamenti industriali e, il traffico veicolare contribuiscono alla immissione in atmosfera di inquinanti primari (idrocarburi incombusti, monossido di carbonio, ossidi di azoto e di zolfo, particolato sospeso e metalli) e secondari (acido nitrico e solforico, ozono, aldeidi, chetoni), questi ultimi spesso più tossici degli inquinanti di partenza. Ovviamente le specifiche caratteristiche meteorologiche, accompagnate dalle fonti di emissione locali, determinano una variazione quali-quantitativa degli inquinanti su macroscala (città che presentano una elevata piovosità e sono molto ventilate hanno, a parità di emissioni di inquinanti in atmosfera, un'aria più pulita).

I contaminanti possono essere trasferiti dall'atmosfera al suolo (attraverso deposizioni secche ed umide e mediante la caduta di lettiera), accumulandosi nello strato più superficiale ricco di humus e sostanza organica e da questo comparto, poi, possono essere trasferiti alla catena alimentare e alle falde acquifere.

Come per l'aria o l'acqua, la qualità del suolo ha profondi effetti sulla salute e sulla produttività di un ecosistema, tuttavia per il suolo non sono mai stati definiti degli standard di qualità. Il concetto di qualità del suolo è spesso un'astrazione e non può essere ben definito in quanto dipende da fattori esterni, quali uso e gestione del territorio, interazione tra suolo e altri comparti ambientali, priorità socioeconomiche e politiche. Di conseguenza quella che può essere la percezione di un "buon suolo" è diversa a seconda delle priorità che si hanno rispetto alle funzioni e all'uso dello stesso.

Inoltre è da considerare che non è semplice mettere in relazione lo stato di salute della popolazione umana con le condizioni dell'ambiente, e del suolo in particolare, soprattutto se si considerano gli effetti a lungo termine e le molteplici fonti di esposizione ai contaminanti. Una soluzione al problema può essere quella di studiare il fenomeno della contaminazione a scale diverse così da avere molteplici livelli di comprensione della problematica. Certamente il monitoraggio di quegli inquinanti per i quali la letteratura scientifica riporta numerose evidenze di effetti nocivi (quali elementi in traccia e idrocarburi policiclici aromatici) è possibile prima ancora di valutare gli effetti degli inquinanti sull'uomo. Ad esempio il biomonitoraggio può rappresentare un valido strumento nella valutazione di quelli che sono i livelli di esposizione, così come lo studio delle comunità microbiche del suolo può fornire importanti indicazioni, a livello ecosistemico, sulle relazioni esistenti tra attività biologiche e contaminazione.

INTRODUZIONE

➤ La “qualità del suolo”: una problematica complessa

Il suolo è un comparto ambientale di fondamentale importanza, che assicura una serie di funzioni chiave (figura 1) dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale, che sono indispensabili per la vita:

- Produzione alimentare e di altre biomasse

Agricoltura, attività agricole e silvicolture dipendono dal suolo per l’apporto di acqua e nutrienti e per l’ancoraggio delle radici.

- Fonte di materie prime

Il suolo fornisce una serie di materie prime quali argilla, sabbia, minerali e torba.

- Stoccaggio, filtraggio e trasformazione

Il suolo svolge un ruolo essenziale nel processo di decomposizione ed inoltre funziona da filtro di protezione (capacità di adsorbire sostanze anche nocive alla matrice solida) sia per le falde acquifere che per la catena alimentare, ed è importante per gli scambi gassosi con l’atmosfera.

- Habitat e pool genico

Il suolo costituisce l’habitat per una grande varietà e quantità di organismi, con un elevato pool genico.

- Ambiente fisico e culturale dell’umanità

Il suolo costituisce la piattaforma delle attività umane, è un elemento del paesaggio ed assume un valore storico e culturale (EU, 2002a; Blum, 2006).

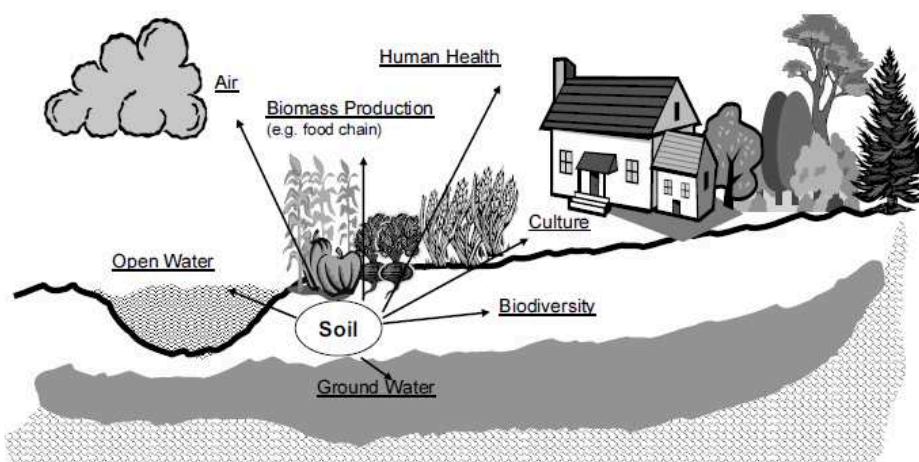


Figura 1: Beni e servizi prodotti dal suolo (in Blum, 2006).

Poiché i processi di formazione del suolo sono estremamente lenti, tale risorsa può essere considerata come non rinnovabile, pertanto per assicurarne le numerose funzioni è necessario monitorare e proteggere la funzionalità e lo stato di salute di tale sistema. Queste esigenze sono emerse in modo sempre più insistente a partire dal Summit della Terra di Rio de Janeiro (1992), prima conferenza mondiale dei Capi di Stato sull'ambiente e, più di recente, col sesto programma di azione della Commissione Europea (EU, 2001), attualizzato nella "Strategia tematica per la protezione del suolo" (EU, 2006). In questo documento si riconosce che la degradazione dei suoli è guidata o esacerbata da attività umane, quali inadeguate pratiche agricole o forestali, attività industriali, turismo, espansione urbana e industriale. Tali attività determinano perdita di fertilità, di carbonio, di biodiversità, capacità di trattenere acqua, alterano i cicli dei nutrienti e riducono la degradazione di contaminanti; hanno quindi un impatto estremamente negativo sul suolo, impedendo a tale sistema di svolgere funzioni e servizi per l'uomo e l'ecosistema.

In questo complesso contesto si inserisce il concetto di "qualità del suolo". Tale concetto ha iniziato a svilupparsi alla fine degli anni '70 grazie a Warkentin e Fletcher (1977) i quali, oltre a sottolineare che le diverse tipologie di uso del suolo influenzavano gli aspetti decisionali legati alla gestione, ritenevano che non poteva esistere una singola misura in grado di stabilirne la qualità. In America, questi temi sono stati ripresi solo intorno alla metà degli anni '80 in quanto la priorità degli amministratori era quella di frenare l'erosione e minimizzare la perdita di produttività legata alla perdita di suolo (Pierce et al., 1984). Nel 1991 la "qualità del suolo" fu definita da Larson e Pierce come la capacità di un suolo di funzionare e di interagire positivamente con l'ecosistema circostante ; questo concetto cominciò ad essere visto come una possibilità dinamica e sensibile di verificare le condizioni del suolo in risposta alla gestione o allo stress dovuto a cause naturali e/o antropiche.

Con la pubblicazione del libro *"Soil and Water Quality: An Agenda for Agriculture"* (National Research Council, 1993) l'interesse della comunità scientifica e degli amministratori per il concetto di qualità del suolo è cresciuto notevolmente e si sono susseguiti numerosi congressi e pubblicazioni (Doran et al., 1994; Doran e Jones, 1996) che riportavano definizioni, identificavano funzioni chiave del suolo e suggerivano usi diversi per le diverse tipologie di suolo (Doran e Parkin, 1994).

La Società Americana di Scienze del Suolo nel 1994 ha nominato una commissione (costituita da membri afferenti a diversi settori) col compito di definire il concetto di "qualità del suolo". Dopo accesi dibattiti la commissione ha formulato tale concetto come "la capacità di una specifica tipologia di suolo di funzionare, in ecosistemi naturali o gestiti, di sostenere la produttività di piante ed animali, di mantenere o migliorare la qualità dell'acqua e di supportare la salute e le attività umane" (Karlen et al, 2003).

Ancora oggi risulta molto complesso dare una definizione di qualità del suolo esaustiva, anzi emerge che a seconda dell'uso cui il suolo è destinato il concetto di qualità può essere diverso (Karlen et al., 1997). Di conseguenza, risulta altrettanto difficile definire degli indicatori di qualità in grado di riflettere pienamente la funzionalità di un suolo. Esistono indicatori qualitativi e quantitativi che in generale devono avere le seguenti caratteristiche (Doran e Parkin, 1996):

- essere ben correlati con i processi ecosistemici;
- integrare processi e proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo;
- essere utili ad interpretare proprietà e funzioni del suolo che non è possibile misurare direttamente;
- essere accessibili per diversi utilizzatori;
- essere abbastanza sensibili da riflettere le influenze dovute alla gestione e ai cambiamenti climatici a lungo termine, ma non tanto da essere influenzati da cambiamenti nel breve termine;
- far parte dei database sul suolo.

Per fare uno screening dello stato di salute di un suolo in prima analisi si possono determinare quei parametri che danno un'idea generale dello specifico sistema che si sta studiando e poi si può procedere con indagini più specifiche. Stabilire però quali e quanti indicatori vadano utilizzati per caratterizzare un suolo è oggetto di numerosi dibattiti nel mondo scientifico proprio perché è difficile dare un'idea esaustiva della complessità del sistema suolo usando un numero limitato di parametri che interagiscono tra loro e che variano nel tempo e nello spazio.

Larson e Pierce (1991) per superare questi problemi avanzarono l'idea che per definire lo stato di salute di un suolo dovesse essere fissato un minimum data set (MDS) di parametri da utilizzare e che si dovessero standardizzare delle metodologie e procedure in grado di individuare cambiamenti nei parametri fissati. A partire dal MDS proposto ne sono seguiti altri (Doran e Parkin, 1994; Larson e Pierce, 1994) insieme al dibattito sulle modalità di espressione dei risultati (Ellert e Bettany, 1995; Reganold e Palmer, 1995) in quanto ciò influisce sull'interpretazione del significato ecologico dei parametri misurati.

Le funzioni del suolo possono essere definite in termini di proprietà chimiche, fisiche e biologiche e di processi da esse controllate (tabella 1) e per avere un'idea il più esaustiva possibile è necessario integrare tutte le risposte che vengono fornite dal sistema.

Tabella 1: indicatori della qualità del suolo e parametri da essi influenzati (tradotta da Karlen et al., 1997).

Parametro	Processo
Sostanza organica	Ciclo dei nutrienti, ritenzione di acqua e contaminanti e xenobiotici, struttura del suolo
Infiltrazione	Runoff e lisciviazione potenziale, efficienza di utilizzo dell'acqua dalle piante, erosione potenziale
Aggregazione	Struttura del suolo, resistenza alla erosione, emergenza dei germogli, infiltrazione
pH	Disponibilità di nutrienti, assorbimento e mobilità di contaminanti e xenobiotici
Biomassa microbica	Attività biologica, ciclo dei nutrienti, capacità di degradare xenobiotici
Disponibilità di N	Disponibilità per le colture, lisciviazione potenziale, tasso di mineralizzazione e immobilizzazione
Bulk density	Penetrazione delle radici delle piante, riempimento dei pori da acqua o aria, attività biologica
Profondità del suolo superficiale	Volume dell'apparato radicale, disponibilità di acqua e nutrienti
Conducibilità o salinità	Infiltrazione di acqua, crescita delle colture, struttura del suolo
Disponibilità di nutrienti	Capacità di supportare la crescita delle colture, qualità ambientale

A seconda dello scopo per cui viene fatta la valutazione del suolo, possono essere confrontati una serie di infiniti parametri (Karlen et al., 1997) e l'uso di un indicatore piuttosto che un altro dipende in larga misura da quanto questo è conosciuto rispetto al suo significato ecologico.

Di seguito sono descritti i parametri considerati nel presente studio per avere un quadro quanto più possibile esaustivo dei sistemi studiati.

Sostanza organica

La sostanza organica del suolo rappresenta la maggiore riserva di carbonio sulla Terra. Essa è costituita da biomassa e necromassa di origine vegetale, animale e microbica, dalla sostanza organica solubile, dagli essudati radicali, dalle sostanze umiche e dagli enzimi del suolo (Nardi, 2000). Processi di trasformazione continui (decomposizione, processi dinamici della sostanza organica solubile, stabilizzazione della stessa sostanza organica per interazione con la componente minerale del suolo) influenzano il contenuto di sostanza organica del suolo. Tali processi sono regolati da fattori climatici, fisici e chimici, quali pH, rapporto C/N quantità e qualità dei residui stessi (Nardi, 2000), ma anche da fattori biologici legati alle caratteristiche della comunità edafica. Oltre ad essere fondamentale come risorsa la sostanza organica ha un ruolo importantissimo nel determinare le caratteristiche chimico-fisiche del suolo.

La sostanza organica influenza infatti la struttura del suolo (Bullini et al., 1998; Pignatello, 1998), stabilizza gli aggregati, aumenta la capacità di ritenzione idrica, rappresenta una riserva di nutrienti,

ha elevata capacità di scambio cationico, è substrato per i microrganismi e la fauna del suolo, lega ioni metallici e riduce la conduzione di calore (Bullini et al., 1998). L'humus del suolo può inoltre adsorbire gli enzimi extracellulari che, così, legati, mantengono la loro attività, risultando protetti dalla proteolisi e dalla degradazione dovuta al pH o alla temperatura (Nannipieri et al., 2002). Grazie alla sua elevata capacità di scambio cationico la sostanza organica, oltre a trattenere ioni metallici indispensabili per la vita delle piante determina l'adsorbimento (e quindi il confinamento) di metalli tossici riducendone la tossicità per gli organismi.

pH

Il pH della soluzione del suolo può mostrare variazioni legate al contenuto di sostanza organica, alla mineralogia, alla eterogeneità del suolo, alle caratteristiche climatiche, all'orientamento dei processi pedogenetici e alla copertura vegetale (Provini et al., 2003).

Spesso risulta complesso studiare le variazioni del pH rispetto ai fattori che le determinano in quanto nel suolo si hanno una serie di reazioni concatenate tali che gli stessi parametri che possono alterare il pH ne sono a loro volta influenzati.

L'attività biologica del suolo può influenzare il pH portando in alcuni casi ad una acidificazione, in altri ad una alcalinizzazione. Ad esempio le radici durante la loro crescita rimuovono dalla soluzione del suolo cationi quali Ca^{++} , Na^+ , K^+ e Mg^{++} liberando H^+ ; inoltre, se le piante assorbono ammonio, rilasciano H^+ nel suolo, se invece assorbono nitrato rilasciano bicarbonati e OH^- (Killam, 1994). Anche il processo di decomposizione operato dai microrganismi influenza il pH del suolo, soprattutto in condizioni di saturazione di acqua e carenza di ossigeno, in quanto vengono rilasciati acidi organici che tendono ad acidificarne la soluzione. Infine, gli stessi processi di respirazione che hanno luogo nel suolo possono influire sulla sua acidificazione in quanto la CO_2 prodotta può essere convertita in acido carbonico (Killam, 1994).

Fenomeni esterni, quali ad esempio le piogge acide, agiscono sul pH del suolo determinando alterazioni nel ciclo dei nutrienti, nella decomposizione e nella produttività (Bååth, 1989; Myrold e Nason, 1992); nei processi di nitrificazione (Sitaula et al., 2001) e fissazione dell'azoto (Denison et al., 1977). Alterazioni del pH del suolo influenzano anche la biomassa microbica e il tasso di respirazione (Anderson e Domsch, 1993), nonché la struttura delle comunità microbiche (Pennanen et al., 1998).

L'effetto delle piogge acide può risultare benefico in suoli poveri di N e S in quanto esse determinano un apporto di questi nutrienti (Aber et al. 1989; Cole 1992; Gundersen 1992; Jussy et al., 2004), ma allo stesso tempo possono ridurre la disponibilità di P (Jussy et al., 2004).

Metalli pesanti e piogge acide sono strettamente collegati in quanto il pH è uno dei fattori che maggiormente influisce sulla disponibilità di questi composti (Pennanen et al., 1998): in condizioni di pH basso la solubilità dei metalli è maggiore e quindi lo è anche la loro disponibilità per le piante (Hell e Stephan, 2003), e ciò può determinare effetti tossici. Per valori di pH fortemente acidi o fortemente basici diminuisce la solubilità di alcuni elementi: nel caso di pH acido, ad esempio, aumenta la concentrazione di Al^{3+} al punto da diventare tossica per la maggior parte delle piante e anche Mn e Fe (essenziali per le piante) possono raggiungere livelli che causano fenomeni di tossicità; per valori di pH basici elementi quali Fe, Mn (Bullini et al., 1998) e P (Killam, 1994) vengono fissati in composti insolubili e quindi resi indisponibili per le piante.

Anche le attività biologiche del suolo risultano direttamente influenzate dal pH. L'apparato radicale della maggior parte delle piante, ad esempio, viene danneggiato a contatto con una soluzione a $pH < 3$ o > 9 . Inoltre l'attività e il range di distribuzione dei microrganismi dipende fortemente da questo parametro. Molti studi riportano variazioni della struttura della comunità microbica in funzione del pH su grande, media e piccola scala spaziale in relazione a gradienti naturali (Bååth e Anderson, 2003; Hackl et al., 2005; Högberg et al., 2003, 2007; Nilsson et al., 2007; Iovieno et al., 2010), ad alterazioni antropiche (Frostegård et al., 1993; Bååth e Arnebrant, 1994; Bååth et al., 1992, 1995; Rousk et al., 2010) o in esperimenti in microcosmi (Kelly et al., 1999; Marschner et al., 2004).

Importanti sono anche le variazioni che si verificano nei microsites: la maggior parte dei batteri (come gli azoto fissatori e i nitrificanti) hanno il loro massimo di attività a pH prossimi alla neutralità; i batteri patogeni del suolo sono più abbondanti in suoli neutri o basici, mentre i funghi patogeni si trovano in prevalenza in suoli acidi (Bullini et al., 1998). Molti microrganismi possono tollerare particolari condizioni di pH lontane dal loro optimum e, inoltre molti di essi crescono in colonie o in biofilm che li proteggono dal pH della soluzione (ciò complica lo studio delle relazioni tra attività biologiche e pH) (Van Elsas, 2006).

Nutrienti

Il biota del suolo ottiene i nutrienti direttamente dal sistema edafico (ad eccezione del C per le piante e i microrganismi autotrofi e dell'N per gli azotofissatori), (Killam, 1994). Tra soluzione circolante del suolo e costituenti nei quali i nutrienti si trovano in forma diversa (combinati con colloidali minerali e organici, adsorbiti sulle superfici degli scambiatori) hanno luogo fenomeni di natura chimica, chimico-fisica e biologica che ne determinano la liberazione o l'immagazzinamento nel suolo.

Le reazioni di solubilizzazione, desorbimento e mineralizzazione portano alla mobilitazione dei nutrienti con conseguente aumento della concentrazione nella soluzione del suolo. Al contrario, le

reazioni di precipitazione, adsorbimento, organicazione e umificazione ne provocano l'immobilizzazione temporanea e ne diminuiscono la presenza nella fase liquida. I nutrienti possono inoltre essere allontanati dal suolo a seguito di fenomeni di lisciviazione, volatilizzazione (NH_3 , N_2 , N_2O), asportazione colturale ed erosione (Violante, 2002).

La concentrazione dei nutrienti nella soluzione del suolo è generalmente poco elevata e varia notevolmente a seconda delle caratteristiche della pedosfera, del contenuto di acqua, del pH, della capacità di scambio cationico, del potenziale redox, della quantità di molecole umiche, dell'attività microbica, delle deposizioni atmosferiche e della eventuale somministrazione di fertilizzanti (Violante, 2002).

La sola presenza di un elemento quindi non indica la reale possibilità da parte di piante e microrganismi di utilizzarlo, quella che va considerata è l'effettiva disponibilità (Businelli, 2007).

Quando si parla di nutrienti del suolo ci si scontra con problemi di classificazione, in quanto alcuni elementi sono considerati essenziali per piante e microrganismi, altri sono importanti solo per l'una o l'altra categoria, alcuni possono risultare tossici a concentrazioni poco superiori a quelle ottimali.

Più in generale i nutrienti possono essere suddivisi in macronutrienti (N, P, K, Ca, Mg, S) e in micronutrienti (B, Cu, Fe, Cl, Mn, Mo, Zn). Questi ultimi (definiti anche elementi minori, elementi in traccia, oligo-elementi) sono quegli elementi essenziali in quantità molto limitate per la crescita delle piante (e per il metabolismo microbico), che non possono quindi essere sostituiti da altri elementi. Elementi quali Na, Co, I, Al, Si sono definiti vantaggiosi o utili per alcune specie vegetali, mentre Se e F sono indispensabili nell'alimentazione del bestiame da allevamento e quindi devono essere presenti in quantità sufficienti nei foraggi (Violante, 2002). La mobilità e le interazioni tra elementi sono fattori che ne determinano la disponibilità: ad esempio Cd e Zn risultano più mobili di Cu e Pb che formano complessi con gli acidi fulvici (Greger, 1999); inoltre macronutrienti quali P, K, Ca possono inibire l'assorbimento degli elementi in traccia (Violante, 2002). Concentrazioni troppo basse o troppo elevate dei micronutrienti determinano alterazioni nelle piante. Se infatti vi è una carenza nel contenuto di elementi in traccia nel suolo, le piante possono mostrare deficit nella crescita, senescenza prematura o danni fogliari che si manifestano attraverso necrosi e clorosi dei tessuti. Concentrazioni troppo alte di questi oligoelementi determinano per contro, l'insorgere di fenomeni di tossicità.

Acqua

L'acqua del suolo riveste notevole importanza poiché grazie ad essa sono possibili tutti i processi fisici, chimici e biologici attivi nella pedosfera, contribuisce a determinare i caratteri morfologici

del profilo (Violante, 2002), regola il potenziale osmotico ed elettrico e il pH della soluzione del suolo (Killam, 1994).

Numerosi fattori possono influenzare il contenuto di acqua nel suolo e la sua mobilità; importanti sono ad esempio il clima, la tessitura, le dimensioni e la distribuzione dei pori.

L'attività biologica del suolo è strettamente legata al movimento di acqua: laddove si muove acqua si muovono anche ioni e nutrienti; l'acqua inoltre disperde calore, crea nuovi potenziali habitat e ne chiude altri (Van Elsas, 2006).

La disponibilità idrica per le piante dipende non tanto dalla quantità assoluta di acqua presente, quanto dallo stato idrico del suolo. Nel suolo, l'acqua effettivamente disponibile per le piante è quella compresa tra la capacità di campo (acqua trattenuta dal suolo dopo che l'acqua gravitazionale è stata allontanata) e il punto di appassimento (frazione di acqua non assorbibile, che comprende l'acqua che riveste le particelle di suolo e quella capillare), che sono caratteristiche intrinseche del suolo, dipendenti dalle caratteristiche mineralogiche e dal contenuto di sostanza organica, pertanto suoli con caratteristiche tessiturali diverse possono avere uno stato idrico diverso o confrontabile, indipendentemente dal loro tenore idrico. Laddove si verificano condizioni di stress idrico le piante possono reagire in modi differenti ad esempio stimolando la produzione di soluti che modificano il potenziale osmotico, riducendo la produzione di essudati radicali o aumentando la velocità di crescita delle radici quando il suolo viene reidratato (Killam, 1994).

Il contenuto di acqua influenza fortemente anche la vitalità dei microrganismi, in quanto ne determina una variazione dello spazio vitale e una alterazione del potenziale osmotico. Per mantenere il turgore cellulare i microrganismi tendono ad accumulare soluti (presi dall'ambiente esterno o sintetizzati all'occorrenza) che possono limitare le attività enzimatiche (Killam, 1994).

La comunità microbica del suolo

Il suolo fornisce un ambiente particolarmente adatto per la vita dei microrganismi. Essi comprendono gli archea, i batteri, i funghi e protozoi (Jenkinson e Ladd, 1981).

Quando si considera il suolo come habitat spesso risulta complesso anche solo immaginare concettualmente tale sistema. A seconda della tessitura, il numero di particelle per grammo di suolo può oscillare da 90 (nella sabbia) a 90 miliardi (nell'argilla) e, assumendo una forma sferica, l'area di superficie può variare da $11 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$ a 8 milioni cm^2g^{-1} (Van Elsas, 2006). La complessità del sistema suolo è legata anche alla sua enorme biodiversità: un grammo di suolo può contenere verosimilmente 10 miliardi di microrganismi appartenenti a migliaia di specie batteriche (Torsvik et al., 1994; Roselló-Mora e Amann, 2001).

Molti aggregati (o protosuoli), che contengono una complessa rete di pori, costituiscono nicchie potenziali o habitat per una o più specie di microrganismi del suolo. Le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche di questi microhabitat differiscono nel tempo e nello spazio (Nannipieri et al., 2003) e, sebbene quest'ultimo sia notevole, solo il 5% è occupato da microrganismi viventi (Ingham et al., 1985).

Batteri e funghi utilizzano strategie diverse per trarre vantaggi da questa complessa matrice: i batteri si trovano più frequentemente sulla superficie delle particelle (dove vivono in colonie) e nei pori più piccoli con diametro da 2 a 6 μm (dove il rischio di essere predati dai protozoi è minimo); i funghi filamentosi tendono invece a colonizzare l'esterno degli aggregati. Con la crescita delle ife, essi formano dei ponti tra regioni separate e in questo modo possono esplorare un più vasto volume di suolo in cerca di risorse e sono capaci di traslocare acqua e sostanze nutritive anche a notevoli distanze. Negli aggregati sono presenti anche protozoi, insetti, nematodi e altri animali che in buona parte si nutrono di batteri e funghi e che con essi concorrono alla formazione e alla conservazione del suolo (Thoreau, 2005).

La distribuzione e l'attività dei microrganismi nel suolo è influenzata, come visto in precedenza, da numerosi fattori. Tra questi è importante menzionare anche la temperatura e la luce. La prima agisce direttamente sul metabolismo microbico ed esercita un'azione indiretta sui microrganismi attraverso l'influenza sulla diffusione dei nutrienti e sulla disponibilità di acqua (Van Elsas, 2006). La luce, invece, oltre ad avere un effetto diretto per i microrganismi fotoautotrofi che vivono vicini alla superficie del suolo, esplica l'effetto più importante in maniera indiretta mediante la stimolazione della germinazione dei semi, l'attecchimento delle plantule e la loro crescita (Lambers, 1998). Le radici delle piante penetrando nel terreno e aerando il suolo, ridistribuiscono acqua e nutrienti e rilasciano composti organici a basso peso molecolare fornendo in questo modo i substrati necessari per la crescita dei microrganismi. In condizioni di bassa intensità luminosa, l'attività metabolica e la respirazione delle radici può essere ridotta fino al 50% (Lambers, 1987) e questo ovviamente influenza l'attività microbica, in quanto i substrati carboniosi diventano limitanti (Broughton e Gross, 2000).

Le comunità microbiche del suolo sono indispensabili per il funzionamento degli ecosistemi terrestri: si assume che l'80-90% dei processi che avvengono in questi sistemi sono mediati da microrganismi (Coleman e Crossley, 1996; Nannipieri e Badalucco, 2003). I microrganismi sono infatti i principali decompositori della sostanza organica e mediante questa funzione assicurano il corretto ciclo dei nutrienti, la sostenibilità e la produttività del sistema suolo; essi inoltre sono agenti essenziali nella pedogenesi, producono sostanze antagonistiche o stimolanti, producono fattori di crescita per gli organismi superiori, sono azotofissatori, produttori primari (Bullini et al., 1998) e

contribuiscono alla promozione della qualità chimico – fisica del suolo attraverso la sintesi di molecole uniche e la stabilizzazione degli aggregati. Inoltre, molto importante risulta il ruolo delle micorrize (simbiosi tra funghi e radici) che possono incrementare la competitività della pianta coadiuvandola nell'assunzione di elementi nutritivi, in particolare P e N; in zone aride concorrono all'assunzione di acqua, consentendo tassi di traspirazione più elevati rispetto a piante non micorrizzate (Thoreau, 2005).

Nonostante il ruolo chiave dei microrganismi del suolo, spesso questi sono ignorati in studi di tipo ecosistemico. Ciò è da attribuire probabilmente alle difficoltà che si presentano nell'isolare e coltivare in vitro la maggior parte dei microrganismi edafici (Domsch et al., 1979; Gray, 1990; Torsvik et al., 1990; Wagner et al., 1993; Torsvik e Øvreås, 2006): a seconda dei metodi di studio utilizzati, infatti, in letteratura sono riportate una serie di limitazioni. Ad esempio, nella fase di estrazione dei microrganismi dal suolo, importante per procedere nella coltivazione in vitro, la difficoltà è data dal fatto che i microrganismi spesso restano adesi al substrato (in particolare a particelle di argilla e limo) e pertanto l'estratto finale può non essere rappresentativo (Riis et al., 1997). Inoltre, solo una piccola percentuale di microrganismi compresa tra lo 0,01% e 1% può essere coltivata in vitro (Gray, 1990) e si stima che attualmente si conosca meno dell'1% delle specie batteriche (Torsvik e Øvreås, 2002; Bird e Perrier, 2003). Le limitazioni della coltivazione in vitro sono ampiamente conosciute (Wagner et al., 1993) e sono legate all'impossibilità di usare un mezzo di coltura idoneo per tutti i componenti della comunità. Quello che più comunemente accade è isolare e favorire lo sviluppo dei gruppi microbici che crescono più velocemente nelle condizioni colturali piuttosto che quelli con una crescita più lenta (Giller et al., 1997).

Anche le tecniche microscopiche per la conta diretta dei microrganismi negli estratti di suolo presentano le loro limitazioni: la colorazione con arancio di acridina non consente di distinguere tra cellule vive e morte (Ramsay e Bawden, 1983), mentre con le tecniche di microscopia a fluorescenza la conta dei microrganismi è limitata dall'elevata fluorescenza di background del suolo (Casida, 1971; Faegri et al., 1977; Hobbie et al., 1977; Lindahl, 1996).

Senza dubbio l'applicazione di tecniche molecolari allo studio dei microrganismi del suolo ha consentito una maggiore conoscenza delle differenze filogenetiche tra taxa, ma anche queste metodologie presentano delle incognite legate al fatto che sono delle procedure nuove e ancora non si conoscono tutte le possibili limitazioni. Ad esempio l'efficienza della lisi cellulare può variare tra gruppi microbici, tra spore e miceli e tra regioni dello stesso micelio di età differente, influenzando l'estrazione del DNA (Prosser, 2002).

Una nuova frontiera nello studio della comunità microbica del suolo è rappresentata dalla valutazione delle relazioni esistenti tra diversità e funzioni ecosistemiche (Walker 1992; Schultze e

Mooney 1993; Jones e Lawton 1995; Johnson et al., 1996). L'importanza di questo approccio è legata alla considerazione che, specifiche funzioni (piuttosto che particolari specie) possono avere un ruolo rilevante nel definire azioni di conservazione (Bengtsson, 1998). Inoltre, per soddisfare obiettivi gestionali e di sostenibilità può avere più importanza comprendere il legame tra specie chiave o tra gruppi funzionali, piuttosto che focalizzarsi sulla diversità di specie. D'altra parte assumere il numero di specie come indicatore della diversità ecosistemica presupporrebbe che tutte le specie abbiano la stessa importanza rispetto ad una data funzione (Bengtsson, 1998), ma ciò non è sempre realistico.

➤ **Inquinamento del suolo**

L'inquinamento del suolo è un fenomeno di alterazione generato dall'introduzione, più o meno diretta, in questa matrice di sostanze xenobiotiche o dall'incremento di sostanze naturalmente presenti, tale da determinare un'alterazione dei naturali equilibri, tossicità sulle popolazioni o compromettere l'utilizzo del suolo stesso.

La legislazione italiana (DM 471/99) identifica come inquinato un *“sito che presenta livelli di contaminazione o alterazioni chimiche, fisiche o biologiche del suolo o del sottosuolo o delle acque superficiali o delle acque sotterranee tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l'ambiente naturale o costruito”*. Per i valori di concentrazione di inquinanti si considera l'allegato 1 del decreto e in particolare *“...è inquinato il sito nel quale anche uno solo dei valori di concentrazione delle sostanze inquinanti nel suolo o nel sottosuolo o nelle acque sotterranee o nelle acque superficiali risulta superiore ai valori di concentrazione limite...”*.

I contaminanti entrano a far parte dei cicli della materia e, a seconda della loro persistenza, possono permanere per un tempo più o meno lungo nei vari comparti ambientali.

Spesso per il suolo è operata una distinzione tra contaminazione locale (o puntiforme) e contaminazione diffusa. La contaminazione locale è associata ad attività minerarie, industriali e alla presenza di discariche (che spesso operano o hanno operato senza rispettare i requisiti tecnici minimi previsti dalla direttiva sulle discariche 31/1999/CE); si parla invece di inquinamento diffuso in riferimento alle deposizioni atmosferiche (secche e/o umide), alle pratiche agricole (uso di fertilizzanti, fitofarmaci, reflui zootecnici e fanghi di depurazione), ad inadeguate operazioni di riciclo dei rifiuti e trattamento delle acque reflue (Olazàbal, 2003). Inoltre, apporti di inquinanti al suolo possono derivare anche dalla caduta di foglie e dall'accumulo di lettiera, da processi di *troughfall* e *stemflow* (dilavamento di chioma e tronco di alberi).

In atmosfera sono presenti composti che possono derivare da processi naturali (CO₂, CO, CH₄, NO_x, SO₂, H₂S), ma anche composti legati prevalentemente alle attività umane quali elementi in traccia,

composti organici e particolato. Tra i composti organici emessi vi sono gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) che sono rilasciati prevalentemente da fonti industriali in processi che richiedono elevate temperature (Cole et al., 1984). Il particolato (PM) è costituito da una componente primaria (particelle rilasciate in maniera diretta), e da una componente secondaria che si forma in atmosfera attraverso reazioni chimiche tra inquinanti originariamente emessi come gas (Gilli et al., 2007). Generalmente esso viene classificato in base alle dimensioni: diametro $<2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) o $<10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) (Chan et al., 1997) o anche $<1\ \mu\text{m}$ (PM_1). Il PM_{10} tende a sedimentare in prossimità delle fonti di emissione per effetto della gravità, mentre il particolato di dimensioni inferiori mostra tempi di permanenza in atmosfera più lunghi e può essere trasportato anche a grandi distanze dai venti. Composti organici e metalli presenti in atmosfera possono essere intrappolati nel particolato e con esso possono poi depositarsi sul suolo (e su altre superfici). Numerosi studi epidemiologici forniscono evidenze sull'associazione tra esposizione al PM e mortalità e/o malattie di vario genere (Dockery et al., 1993; Pope et al., 1995; Samet et al., 2000; Schwartz 2000; Katsouyanni et al., 2001; Krewski et al., 2003; Englert 2004; Krewski et al., 2004).

Il suolo ha una capacità innata di resistere all'inquinamento e di mettere in atto dei meccanismi di attenuazione (Suthersan, 1999), riducendo gli effetti derivanti dall'immissione di sostanze inquinanti (Goldberg e Zaccheo, 2003). I meccanismi di attenuazione naturale includono processi chimici, fisici e biologici quali la dispersione, l'adsorbimento, la volatilizzazione, l'ossidazione abiotica, l'idrolisi e la biodegradazione (Gianfreda e Rao, 2004).

Diversamente da quanto accade per altri comparti ambientali, come l'atmosfera e l'idrosfera (dove il processo di diluizione svolge un ruolo importante nella riduzione del carico di inquinanti), i contaminanti che arrivano al suolo tendono ad accumularsi e a permanere per lunghi periodi di tempo; ciò fa sì che spesso i danni vengano evidenziati solo in uno stato molto avanzato, talvolta quando si è vicini alla fase di non reversibilità. I fenomeni di adsorbimento ad esempio, sottraggono gli inquinanti alla soluzione del suolo (salvaguardando gli altri comparti ambientali) e ne consentono la permanenza per un tempo più lungo nel suolo stesso.

La capacità autodepurativa del suolo ha un limite oltre il quale i danni divengono irreversibili. Quando la capacità meccanica di filtrazione, la capacità tampone e quella microbiologica e biochimica di trasformazione sono esaurite, gli inquinanti organici e inorganici possono essere trasferiti dalla matrice suolo alle altre matrici ambientali e contaminare corsi d'acqua, falde acquifere e catene alimentari attraverso la loro assimilazione da parte delle piante e degli animali (determinando spesso fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione).

Le minacce per un suolo contaminato quali erosione, perdita di fertilità, perdita di biodiversità e desertificazione possono presentarsi anche simultaneamente quindi è di fondamentale importanza

istituire un sistema di monitoraggio diffuso che costituisca la base di informazione per formulare azioni coerenti in futuro (Olazàbal, 2003). Ad oggi, benché le problematiche relative al suolo non abbiano solo una dimensione locale ma anche conseguenze a livello mondiale, non esiste un approccio comunitario generale per la protezione del suolo.

Nel presente lavoro saranno studiati, in particolare, elementi in traccia e IPA ponendo particolare attenzione agli effetti di questi contaminanti sulle comunità microbiche del suolo.

Elementi in traccia

Tra gli elementi in traccia, alcuni sono indispensabili per la vita degli organismi autotrofi ed eterotrofi, seppur richiesti in concentrazioni molto basse e per tale motivo definiti "micronutrienti", altri non svolgono alcun ruolo biologico e risultano tossici anche in minime dosi. Alcuni hanno densità superiore a $5,0 \text{ g cm}^{-3}$, da qui la denominazione di "metalli pesanti" (Webster, 1976; Nies, 1999), comportamento simile ai cationi, attitudine a formare complessi, bassa solubilità dei loro idrati, stati di ossidazione diversi a seconda delle condizioni di pH e del potenziale redox, grande affinità per i solfuri (tutte caratteristiche che incidono sulla potenziale tossicità). Tale categorizzazione, comunque, ha uno scarso significato biologico e in ogni caso non vi sono in letteratura definizioni univoche (Duffus, 2002). Inoltre, la classificazione di un elemento non è sempre semplice, soprattutto quando si considerano elementi che per piccolissime differenze di concentrazione sono essenziali oppure tossici o elementi che sono indispensabili per le piante, per gli animali o per entrambi. Ad esempio alcuni elementi quali Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Zn sono essenziali in piccole concentrazioni per la vita di piante e/o animali (tabella 2), sebbene tutti siano tossici ad elevate concentrazioni. Ancora, Gadd (1993) indica Cu, Fe, Mn, Mo, Zn e Ni come elementi essenziali per la crescita dei funghi e Cr, Cd, Pb, Hg e Ag come elementi non necessari. Tra gli elementi che destano maggiori preoccupazioni per la salute umana e sono oggetto di studio dell'ecotossicologia vi sono As, Cd, Hg, Pb, Tl, e U (Alloway, 1995).

Nel presente lavoro questo vasto gruppo di elementi sarà indicato con i termini "elementi in traccia" o "metalli" o ancora "elementi potenzialmente tossici".

Sono numerose le applicazioni in cui viene fatto largo uso di questi elementi (tabella 3).

Negli ultimi decenni, i flussi relativi ai diversi elementi in traccia (in particolare piombo, cadmio, mercurio e cromo) sono cresciuti, superando abbondantemente quelli naturali. Ciò è imputabile alla crescente domanda ed utilizzo di prodotti che li contengono e, come conseguenza diretta si è avuto un aumento di alcuni ordini di grandezza sia delle emissioni che dei fattori di esposizione. Inoltre, per quanto riguarda i rapporti che esistono nella produzione e consumo delle materie prime metalliche vi è un notevole squilibrio tra i paesi industrializzati e non (De Vivo et al., 2004). A

titolo di esempio è mostrato (figura 2) il rapporto tra produzione e consumo di piombo: è importante notare come spesso le aree geografiche di estrazione del metallo non coincidano con quelle di consumo (America del Nord ed Europa occidentale) .

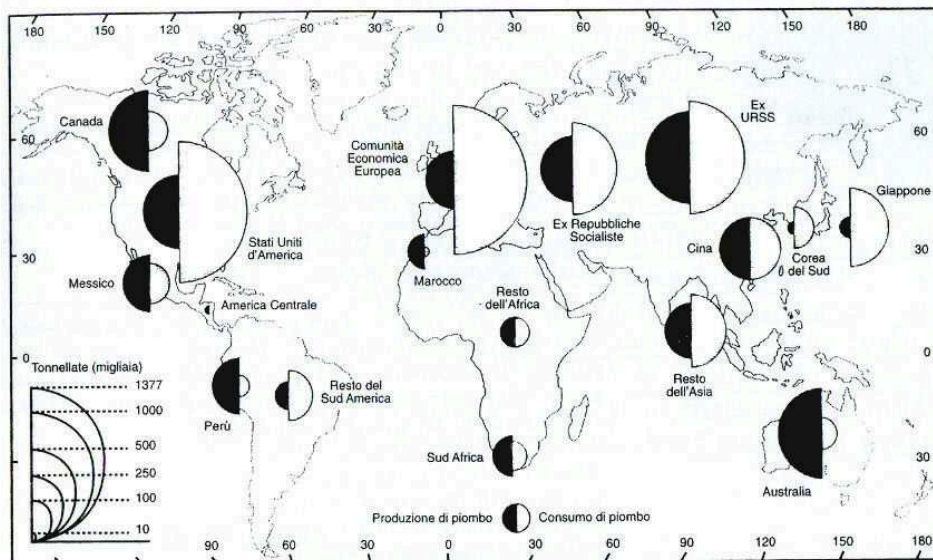


Figura 2: distribuzione produzione/consumo di piombo nel mondo (In. De Vivo et al., 2004)

Le fonti naturali dei metalli sono le rocce e i processi che hanno portato allo loro formazione e quelli che le hanno interessate dopo la litificazione. Come riportato da Alloway (2005), mediamente gli elementi in traccia sono presenti nella crosta terrestre con una concentrazione inferiore all'1% (frequentemente al di sotto dello 0,01% o 100 mg/kg).

A partire dal processo di estrazione da parte dell'uomo e per tutte le fasi successive di lavorazione si può avere una dispersione di questi elementi (Violante, 2002), inoltre diverse attività umane contribuiscono alla immissione di elevate concentrazioni nell'ambiente. Sono da menzionare l'irrigazione, l'uso di pesticidi, di concimi, l'uso di fanghi di depurazione, il traffico autoveicolare, gli impianti di combustione di petrolio e carbone, le discariche, l'incenerimento di rifiuti e il logorio di pneumatici.

I metalli possono solo essere trasformati da uno stato chimico all'altro (Ledin, 2000), pertanto giunti al suolo possono essere trasferiti in altri comparti o essere temporaneamente immobilizzati e, in questi comparti, possono avere tempi di persistenza molto lunghi. La mobilità, la biodisponibilità e quindi la tossicità degli elementi in traccia nel suolo dipende dalla loro concentrazione, dalla forma chimica in cui essi sono presenti, dalla natura delle associazioni con le altre specie ioniche, dai complessi di scambio del suolo (Krishnamurti e Naidu, 2003).

Il contenuto totale di metalli nel suolo non è, da solo, una misura della loro biodisponibilità (Tack e Verloo, 1995; Peijnenburg et al., 1997); quest'ultima definisce infatti l'effettivo quantitativo di

elementi che può essere utilizzato e che quindi, quando è in eccesso, può causare tossicità (Sunda et al., 1978; Checkai et al., 1987; Wolt, 1994). La biodisponibilità è associata ad una più alta mobilità degli elementi e pertanto ad un rischio più alto che possano provocare effetti tossici sugli organismi (Rauret, 1998). Per poter espletare l'azione tossica è necessario che il contaminante venga in contatto con gli organismi e che raggiunga poi i siti sensibili ad una certa dose e per un tempo determinato. Se non vengono messi in atto meccanismi di detossificazione (accumulo, metabolizzazione, escrezione, intervento di metallotioneine e fitochelatine) allora il contaminante può esercitare la sua azione tossica (Vighi e Bacci, 1998). Questi elementi nelle cellule interagiscono con le biomolecole modificandone la conformazione attiva, bloccando siti funzionali o spostando ioni metallici essenziali, così da ostacolare lo svolgimento di svariate funzioni. Inoltre alcuni di essi quali Cr, Be, As, V, Cu e Ni, sono genotossici; altri, quali Pb e Cd, sono cancerogeni (IARC, 2011).

Molti ricercatori si sono interessati allo studio degli effetti della contaminazione da elementi in traccia sulla salute delle piante e dei microrganismi (Skujins et al., 1986; Coppola et al., 1988; Lorenz et al., 1992; Baccouch et al., 1998). Le prime osservazioni sugli effetti degli elementi in traccia sui processi microbici risalgono all'inizio del secolo scorso (Lipman e Burgess, 1914; Brown e Minges, 1916), ma solo tra gli anni '60 - '70 ci si è resi conto della rilevanza del problema. È riportato, ad esempio, che elevate concentrazioni di elementi in traccia hanno un effetto inibitorio sull'attività dei microrganismi (Braam e Klapwijk, 1981; Ajmal et al., 1981, 1982; Alloway, 1995;), e sulle attività enzimatiche (Vallee e Ulmer, 1972), determinando una riduzione dei processi di decomposizione della sostanza organica (Tyler, 1975; Coughtrey et al., 1979; Berg et al., 1991) e causando un decremento della biomassa microbica (Brookes and McGrath, 1984; Barajas-Aceves, 2005), con conseguenti modifiche nella struttura della comunità (Abaye et al., 2005). In presenza di contaminanti, infatti, i microrganismi del suolo mettono in atto delle strategie adattative che comportano un dispendio energetico (Leita et al., 1995), e una conseguente minore efficienza nell'uso del substrato (Chander e Joergensen, 2001; Chander et al., 2002). Come riportato da Gadd (1992), in presenza di elevate concentrazioni di elementi in traccia, i microrganismi possono presentare meccanismi intrinseci di tolleranza o possono azionare dei meccanismi di detossificazione come risposta diretta ai metalli (in questo caso si parla di resistenza).

Gli effetti degli elementi in traccia sulle comunità microbiche sono stati evidenziati anche per basse concentrazioni e, in ogni caso, essi possono dipendere anche da fattori sito specifici quali la naturale concentrazione di background. Pertanto non è possibile individuare una concentrazione minima comune a tutte le componenti della comunità microbica, al di sotto della quale non si abbiano effetti tossici (Chaudri et al., 2008; Giller et al., 2009).

Lo studio delle relazioni tra microrganismi ed elementi in traccia è complicato dal fatto che specie diverse (Berdicevsky et al., 1993) e ceppi della stessa specie (Romandini et al., 1992) nonché le attività biologiche della stessa specie microbica (Balsalobre et al., 1993; Torslov, 1993) possono mostrare considerevoli differenze nella sensibilità agli elementi in traccia.

In generale i microrganismi possono a loro volta influenzare in vario modo la concentrazione e/o la biodisponibilità di metalli nel suolo mediante trasformazione dello stato di ossidazione, modificandone la mobilità, incidendo sul contenuto di sostanza organica, o mettendo in atto dei meccanismi di accumulo (Ledin, 2000).

Le alterazioni subite dalla comunità microbica in presenza di elementi in traccia si riflettono poi inevitabilmente sugli altri livelli di organizzazione. Ad esempio nei sistemi forestali, l'input di inquinanti (quali i metalli) determina una carenza e uno sbilanciamento dei nutrienti, e una alterazione dei cicli biogeochimici (nei quali sono coinvolti i microrganismi) e ciò può portare ad un generale declino delle fitocenosi forestali (Freedman e Hutchinson, 1978; Poikolainen, 1997; Lukina e Nikonov, 1998; Rautio et al., 1998; Nikonov e Koptsik, 1999; Aamild et al., 2000; Koptsik et al., 2003). Tra i fattori che possono influenzare l'attività delle comunità microbiche in presenza di contaminazione da metalli va considerata la copertura vegetale. Le piante possono infatti influenzare il biota del suolo influenzando la quantità e la qualità dei substrati organici che raggiungono il suolo (Chen et al., 2004). E' dimostrato che differenti specie di piante possono essere associate con comunità microbiche con caratteristiche uniche (Chen et al., 2002) probabilmente a causa di differenze nella quantità e nella qualità degli essudati radicali (Nguyen, 2003).

Ad oggi, mentre per prevedere la tossicità dei metalli per le piante sembra sufficiente studiare le caratteristiche del suolo nel loro insieme (Rooney et al., 2006; Li et al., 2009), per quanto riguarda gli effetti tossici dei metalli sui microrganismi è importante invece considerare anche le caratteristiche dei micro siti che costituiscono una parte importante dell'esposizione. Attualmente la carenza di informazione sui micro siti limita la nostra comprensione su come i metalli influenzino i microrganismi e la loro attività nel suolo (Giller et al., 2009). Va considerato infine, che nel suolo le interazioni positive e negative che si instaurano tra elementi in traccia, microflora e piante avvengono simultaneamente così come in contemporanea si verificano gli effetti di altri fattori. Pertanto è importante studiare i diversi aspetti di questa problematica e cercare di descrivere le conseguenze nel breve e lungo termine, al fine di ricavare una buona interpretazione di quanto si verifica nel sistema suolo.

Idrocarburi policiclici aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti che si generano per combustione incompleta e/o pirolisi di composti organici (Srogi, 2007), alla temperatura di 500° - 700 °C (Toth e Blaas, 1972).

Gli IPA sono costituiti da anelli aromatici fusi e non contengono eteroatomi, né portano sostituenti (Wenzl et al., 2006). La disposizione degli anelli può essere in arrangiamenti lineari, angolari o in cluster (Baek et al., 1991). Gli IPA generalmente vengono raggruppati in funzione del numero di anelli condensati (figura 3) e la loro distribuzione in atmosfera dipende dalla temperatura dell'aria e dalle caratteristiche chimico-fisiche di ciascuno di essi. Ad esempio, la tensione di vapore degli IPA è inversamente proporzionale al numero di anelli aromatici per cui gli IPA a basso peso molecolare “leggeri” (2-3 anelli) si trovano nella fase vapore dell'atmosfera; quelli ad alto peso molecolare “pesanti” (5 o più anelli) sono legati al particolato; e quelli a medio peso molecolare (4 anelli) si dividono in entrambe le fasi a seconda della temperatura (Bidleman, 1988; McLachlan, 1996; Howsam et al.2000, 2001).

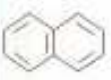



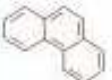



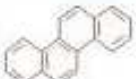

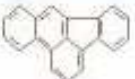
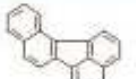



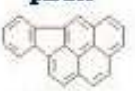
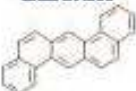


COMPOSTI CON 2 ANELLI BENZENICI				COMPOSTI CON 3 ANELLI BENZENICI		
Naftalene	Acenaftene	Acenafilene	Fluorene	Fenantrene	Antracene	Fluorantene
						
$C_{10}H_8$ M=128 $T_f=82\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{12}H_8$ M=154 $T_f=93\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{12}H_8$ M=152 $T_f=92\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{12}H_8$ M=166 $T_f=114\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{14}H_{10}$ M=178 $T_f=101\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{14}H_{10}$ M=178 $T_f=218\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{16}H_{10}$ M=202 $T_f=110\text{ }^{\circ}\text{C}$
COMPOSTI CON 4 ANELLI BENZENICI						
Pirene	Crisene	Benzo(a)antracene	Benzo(b)fluorantene	Benzo(g)fluorantene	Benzo(k)fluorantene	
						
$C_{16}H_{10}$ M=202 $T_f=150\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{18}H_{12}$ M=228 $T_f=254\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{18}H_{12}$ M=228 $T_f=141\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{18}H_{12}$ M=232 $T_f=168\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{18}H_{12}$ M=232 $T_f=166\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{18}H_{12}$ M=232 $T_f=217\text{ }^{\circ}\text{C}$	
COMPOSTI CON 5, 6 e 7 ANELLI BENZENICI						
Benzo(a)pirene	Benzo(e)pirene	Indeno(1,2,3-cd)pirene	Dibenzo(ah)antracene	Benzo(ghi)perilene	Coronene	
						
$C_{20}H_{12}$ M=252 $T_f=179\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{20}H_{12}$ M=252 $T_f=179\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{22}H_{14}$ M=274 $T_f=164\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{22}H_{14}$ M=278 $T_f=270\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{22}H_{14}$ M=274 $T_f=273\text{ }^{\circ}\text{C}$	$C_{24}H_{18}$ M=300 $T_f=442\text{ }^{\circ}\text{C}$	

Figura 3: classificazione di alcuni IPA

Generalmente le concentrazioni di IPA tendono ad essere circa un ordine di grandezza più alte in inverno rispetto all'estate (Menichini, 1992; Menichini et al., 1999; Park et al., 2002) a causa di una maggiore stabilità atmosferica in inverno, di maggiori emissioni dovute al riscaldamento domestico e di una minore reattività atmosferica degli IPA, per ridotti fenomeni di degradazione per fotossidazione e reazione con i radicali OH. La reattività degli IPA è influenzata in generale, da molti fattori ambientali fra i quali oltre alla temperatura e alla luce sono da menzionare i livelli di ossigeno ed ozono, la presenza di co-inquinanti e di materiale capace di adsorbirli.

Le fonti di IPA si distinguono in naturali e antropiche, anche se si può affermare che la maggior parte di quelli presenti nell'ambiente proviene da fonti antropiche (Yang et al., 1998). Tra le fonti naturali si annoverano incendi boschivi ed eruzioni vulcaniche (Baek et al., 1991; Xu et al., 2006), biosintesi da parte di batteri e piante (Neff, 1979; Azuma et al., 1996; Krauss et al., 2005) e processi di diagenesi a bassa temperatura di materiali organici sedimentari che portano alla formazione di combustibili fossili.

Tra le fonti antropiche che maggiormente contribuiscono alle concentrazioni di IPA in atmosfera ci sono il traffico veicolare (Schauer et al., 2003), gli inceneritori (Harvey, 1991), attività industriali varie quali raffinerie e centrali idroelettriche (Yang et al., 2002; Dyke et al., 2003), particelle di asfalto e usura di pneumatici (Binet, 2002), forni crematori (Santasiero et al., 2005), cracking di prodotti contenenti petrolio e carbone coke (Bradley et al., 1994; Gridin et al., 1997).

L'interesse allo studio di questi composti è legato alle proprietà tossiche, mutagene e/o carcinogene (Goldman et al., 2001, Mastrangelo et al., 1997), nonché alla loro persistenza nell'ambiente. Sono infatti numerose le evidenze legate all'esposizione da IPA (Neff, 1978; Perera et al., 2002; Gaspari et al., 2003; Bopp e Lettieri, 2007) e, alla tendenza di questi composti a bioaccumularsi e arrivare all'uomo anche attraverso gli alimenti, per esempio con la cottura di alimenti su fiamma (Grob et al., 1991; Simko et al., 1995; EU, 2002b; Wenzl et al., 2006). Sebbene gli IPA non rientrino nella "sporca dozzina" della Convenzione di Stoccolma sui composti organici persistenti (Convenzione di Stoccolma, 2006) essi sono stati inclusi nella Convenzione sul trasporto a lunga distanza e transfrontaliero (UN-ECE). Tra gli idrocarburi policiclici aromatici 16 sono stati classificati dall'EPA (US Environmental Protection Agency) come inquinanti prioritari (Bojes e Pope, 2007); inoltre, l'agenzia per la ricerca sul cancro IARC (International Agency for research on Cancer) a partire dal 1987 e con aggiornamenti fino ad oggi (IARC 1987, IARC 2011) ha indicato una serie di IPA come cancerogeni. Per quegli IPA per i quali non sono state trovate evidenze di cancerogenicità va messo in evidenza che essi possono agire in maniera sinergica, in quanto l'esposizione è sempre legata a miscele complesse di questi composti (Wenzl et al., 2006), inoltre essi possono reagire con altri inquinanti formando composti anche più tossici (Park et al., 2002).

Proprio per l'estrema pericolosità di tali inquinanti, il loro monitoraggio è considerato essenziale (European Communities, 1996). In particolare, tra gli IPA il benzo(a)pirene è stato riconosciuto come altamente cancerogeno (Kuo et al., 1998; Wang et al., 2002; IARC 2011) ed è spesso usato come marker per l'esposizione agli idrocarburi (Lin et al., 2002).

Sebbene l'atmosfera rappresenti una fonte diretta di esposizione, la presenza di IPA nel suolo richiede altrettanta attenzione vista l'elevata resistenza alla degradazione e persistenza di questi composti (Wilde Jones, 1995; Maliszewska-Kordybach, 1999). La persistenza nel suolo è determinata dalla complessità strutturale degli IPA e dal fatto che in questo comparto divengono trascurabili i processi di degradazione abiotica che si hanno in atmosfera, sebbene vi siano processi degradativi di diverso tipo. In quest'ottica il suolo diviene uno stabile indicatore della contaminazione ambientale da IPA (Srogi, 2007).

Nel suolo gli IPA possono essere sottoposti a processi di lisciviazione, evaporazione, migrazione (Srogi, 2007) adsorbimento e degradazione (Magee et al. 1991); quest'ultima si può verificare sia in condizioni anaerobiche (Bregnard et al., 1996; Coates et al., 1996; Langenhoff et al., 1996) che aerobiche. Gli IPA (così come altri xenobiotici equiparabili) possono essere alterati da ossidanti abiotici quali Mn e Fe (Wilk et al. 1966; Cremonesi et al. 1989), da minerali argillosi, ossidi e idrossidi di Al, Fe, Mn e Si (Wang et al. 1986), dai radicali di specie attive dell'ossigeno (Gierer et al. 1992), dal metabolismo ossidativo degli enzimi e dagli acidi grassi insaturi dei residui di piante (Mabey et al. 1982; Bogan e Lamar 1995).

Per quanto concerne il metabolismo ossidativo, data la somiglianza di struttura degli IPA alla lignina e data la bassa specificità per il substrato degli enzimi deputati alla sua degradazione (lignina-perossidasi, Mn-perossidasi e laccasi), questi idrocarburi possono fungere da substrato alternativo per i microrganismi. Gli organismi principalmente coinvolti nella produzione di questi enzimi sono i funghi del marciume bianco, ma essi sono stati trovati anche in altre specie fungine (Lambert et al., 1994; Lange et al., 1994; Bezalel et al., 1996; Collins et al., 1996; Lange et al., 1996; Cerniglia, 1997) e batteriche (Cerniglia, 1984, 1992; Givaudan et al., 1993; Sutherland et al., 1995; Claus e Flip, 1997; Willison, 2004). Alcuni ricercatori hanno trovato enzimi simili alle laccasi anche negli insetti (Hopkins e Kramer, 1992; Diamantidis et al., 2001; Kramer et al., 2001) e nelle piante (Mayer e Harel, 1979; Criquet et al., 2000). Questa capacità di degradazione è spesso sfruttata in studi di bioremediation (Šašek et al., 2003) ma va comunque considerato che data l'elevata idrofobicità e il coefficiente di ripartizione tra la fase solida e l'acqua, gli IPA nel suolo tendono ad interagire con la sostanza organica e quindi a non essere facilmente disponibili per la degradazione microbica (Johnsen et al., 2005). In ogni caso la bioremediation non può essere usata come una panacea e il suo utilizzo dipende da diversi fattori quali tipologia, concentrazione e

biodisponibilità dei contaminanti, contenuto di nutrienti organici ed inorganici e storia del sito in esame (D'Annibale et al., 2005). Va inoltre considerato che la maggior parte dei lavori presenti in letteratura riporta la degradazione di IPA a 3 (Gramss et al., 1999) o 4 anelli aromatici (Cerniglia & Heitkamp 1989), meno frequentemente si legge della degradazione di IPA a più anelli (Schneider et al. 1996; Gramss et al., 1999).

Dal momento che gli IPA possono essere usati come substrato, soprattutto nelle fasi iniziali della contaminazione, si può registrare un incremento della respirazione microbica, della biomassa e delle attività enzimatiche (Margesin et al., 2000) e un cambiamento della comunità a favore di organismi in grado di degradare con maggiore efficienza questi composti (Sextone et al., 1978; Song e Bartha, 1990). Negli stadi più avanzati della contaminazione si riportano soprattutto effetti negativi sulle comunità microbiche quali inibizione della deidrogenasi e idrolasi, (Klimkowicz-Pawlas e Maliszewska-Kordybach, 2003) e riduzione della biomassa (Su e Yang, 2009).

Non va trascurato che spesso alla contaminazione da IPA si aggiunge quella da elementi in traccia e ciò può fortemente inibire il metabolismo microbico (Providenti et al., 1993). Una delle possibili spiegazioni di questo fenomeno si basa sull'assunzione che gli IPA essendo lipofili possono penetrare facilmente le membrane cellulari, quindi i metalli legati a questi composti possono a loro volta entrare più facilmente nelle cellule ed influenzarne le funzioni (Sikkema et al., 1994). Inoltre i metalli possono influire sul tasso di degradazione degli IPA ad opera dei microrganismi (Wild et al., 1991).

Tabella 2: Utilizzo degli elementi in traccia potenzialmente tossici immessi nell'ambiente da attività antropiche (De Vivo et al., 2004)

As	Additivo di mangime per animali, conservante del legno (arsenato di rame e cromo), vetri speciali, ceramica, pesticidi, insetticidi, erbicidi, fungicidi, algicidi, bagni per la disinfezione di pecore, componenti elettronici (per es. semiconduttori di arsenato, di gallio, circuiti integrati, diodi, rivelatori all'infrarosso e tecnologia laser), fonderie di metalli non ferrosi, metallurgia, generatori di elettricità geotermica e a carbone, tessile e concerie, vernici anti incrostazioni, filtri, fuochi d'artificio, medicina veterinaria.
Be	Leghe (con Cu), isolanti elettrici in transistors, moderatori o deflettori di neutroni in reattori nucleari.
Cd	Batterie Ni/Cd, pigmenti, rivestimento anti corrosivo di metalli, plastica, stabilizzatori, leghe, combustione di carbone, adsorbitori di neutroni in reattori nucleari.
Co	Metallurgia (superleghe), ceramica, vetri, vernici.
Cr	Manifattura di leghe ferrose (acciai speciali), operazioni di placcatura, pigmenti, tessili e concerie, operazioni per limitare la corrosione di circuiti di raffreddamento, trattamento del legname, audio-visivi.
Cu	Buon conduttore di calore ed elettricità, tubatura per l'acqua, materiale per tetti e da cucina, strumenti chimici e farmaceutici, pigmenti, leghe.
Fe	Colate di ferro, farro battuto, acciaio, leghe, costruzioni edili, trasporti, utensili, macchine industriali.
Hg	Estrazione di metalli (oro) per amalgama, catodi mobili nelle celle cloro-alcaline per la produzione di NaOH e Cl ₂ dalle salamoie, apparecchi elettrici e di misura, fungicidi, catalizzatori, farmaceutici, riempimenti dentari, strumenti scientifici, oscillatori, elettrodi, lampade a vapore di mercurio, tubi Raggi X.
Mn	Produzione di acciai a ferromanganese, biossido di manganese elettrolitico per uso nelle batterie, leghe, catalizzatori, fungicidi, agenti anti-detonanti, pigmenti, essiccatori, conservanti per legno, rivestimento di barre per saldatura.
Mo	Leghe negli acciai, colate di ferro e metalli non ferrosi, in chimica (catalizzatori, coloranti, lubrificanti, inibitore nella corrosione, ritardanti per fiamme, inibitore del fumo, elettro-placcature).
Ni	Come lega nell'industria dell'acciaio, elettroplaccature, batterie Ni/Cd, barre per le saldature per arco metallico, pigmenti per vernici e ceramica, protesi chirurgiche e dentarie, stampi per contenitori di ceramica e vetro, componenti per computer, catalizzatori.
Pb	Antidetonanti, piombo tetrametile, batterie, pigmenti, industria vetraia e ceramica, plastica, leghe, lastre, protezione per cavi, lega per saldature, tubature.
Sb	Leghe per prevenire la corrosione, applicazioni elettriche, peltro, lega Britannia, come fulminante nella manifattura di munizioni, semiconduttore, pigmenti a prova di fiamma, medicine per malattie parassitiche, come nauseante, come espettorante, combustione di combustibili fossili.
Se	Nell'industria vetraria, semiconduttori, elementi termici, celle fotoelettriche e materiale xerografico, pigmenti inorganici, produzione della gomma, acciaio inossidabile, lubrificanti, trattamento della forfora.
Sn	Acciaio placcato di Sn, ottone, bronzo, peltro, amalgama dentale, stabilizzatori, catalizzatori, pesticidi.
Ti	Per pigmenti bianchi (TiO ₂), come agente filtro dei raggi UV (creme solari), come agente di nucleazione per il vetro ceramico, per le leghe in aeronautica.
Tl	Usato nelle leghe (con Pb, Ag o Au) con proprietà speciali, nell'industria elettronica, per sistemi ottici all'infrarosso, come catalizzatore, termometri a basse temperature, semiconduttori, superconduttori.
V	Nella produzione di acciaio, nelle leghe, catalizzatori.
Zn	Leghe (bronzo, ottone), rivestimenti anti-corrosione, batterie, scatolame, stabilizzatori PVC, per precipitare Au da soluzioni di cianuro, in medicina e nei prodotti chimici, industria della gomma, vernici, lega per saldatura.

Tabella 3: micronutrienti essenziali per il funzionamento ottimale degli organi e dei processi biologici negli esseri umani e metalli pesanti non – essenziali (da Merian, 1991; Fergusson, 1990). Sono riportati per comparazione i dati relativamente ai macronutrienti essenziali e altri micronutrienti essenziali (da Crounse et al., 1983).

Metalli pesanti micronutrienti essenziali (alcuni mg o µg al giorno)	As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, V, Zn
Metalli pesanti non essenziali	Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Ti
Macronutrienti (~ 100 mg o più al giorno)	Ca, Cl, Mg, P, K, Na, S
Altri micronutrienti essenziali	F, I, Si
Ni e Sn possono essere micronutrienti essenziali (Crounse et al., 1983)	

➤ Il biomonitoraggio

Il monitoraggio dell'inquinamento atmosferico è un problema complesso in quanto devono essere identificate le fonti di emissione e stabiliti valori limite di concentrazione degli inquinanti, e deve essere condotta una valutazione del rischio, senza trascurare l'aspetto economico (Sloof, 1993; Wolterbeek e Freitas, 1999). Le misure effettuate con le centraline strumentali di monitoraggio (che impiegano metodi fisico-chimici di rilevamento) forniscono in continuo i valori delle concentrazioni dei singoli inquinanti, evidenziando tempestivamente l'eventuale superamento dei livelli di attenzione e di allarme per la salute pubblica, nonché l'efficienza delle misure adottate per ridurre l'inquinamento atmosferico. Per avere dati rappresentativi della variabilità spaziale e temporale delle concentrazioni di inquinanti in atmosfera è necessario però effettuare più campionamenti nel tempo e in molti siti (Slanina et al., 1990). Il monitoraggio mediante centraline è in genere associato ad elevati costi in quanto richiede strumentazioni per l'analisi dei singoli inquinanti e forza lavoro (Ham, 1992; Van Duijvenbooden, 1992). Le limitazioni economiche si riflettono nel fatto che spesso vengono effettuati studi in ristrette aree geografiche (Alves et al., 1998a, b), o riferiti all'impatto di specifiche fonti di emissione (Sverdrup et al., 1991).

Una tecnica di monitoraggio della qualità dell'aria, complementare al monitoraggio strumentale, è rappresentata dal biomonitoraggio, vale a dire l'uso di organismi vegetali e/o animali che permettono di evidenziare gradienti spazio-temporali di contaminazione (Wolterbeek, 2003). I vantaggi del biomonitoraggio sono molteplici: consente di evidenziare interazioni sinergiche tra inquinanti e i loro effetti sugli organismi e sulle comunità, fornisce (grazie all'ampia distribuzione dei biomonitori e ai bassi costi) un'alta densità spazio-temporale di dati (che compensa la variabilità intrinseca degli organismi) e infine fornisce dati integrati nel tempo e nello spazio e non puntiformi. Nel biomonitoraggio si possono utilizzare organismi bioindicatori o bioaccumulatori. Nel primo caso l'organismo sensibile indica la presenza di un particolare inquinante attraverso la manifestazione di un danno (visibile o rilevabile a livello metabolico o biochimico); nel secondo caso, invece, l'organismo tollerante è in grado di accumulare nei propri tessuti uno o più inquinanti, senza mostrare sintomi visibili di danno. Tali tessuti possono poi essere sottoposti ad analisi chimiche per verificare la presenza e le concentrazioni di specifici contaminanti.

Solitamente, nel biomonitoraggio sono più utilizzate le piante degli animali in quanto essendo sessili sono in grado di riflettere più fedelmente le variazioni di concentrazione e i profili di deposizione su scala spazio-temporale. Quando si usano specie vegetali che crescono naturalmente nell'area indagata, si parla di biomonitoraggio passivo per distinguerlo da quello attivo che, invece, viene effettuato esponendo una particolare specie in diversi siti per un tempo definito e in condizioni standardizzate.

Negli ultimi decenni molte specie vegetali, licheni, muschi, felci, piante superiori, sono state utilizzate come bioindicatori e/o come bioaccumulatori in studi di biomonitoraggio per valutare la contaminazione da elementi in traccia e IPA (Monaci et al., 2000; Hyun-Min et al., 2003; Wolterbeek, 2003; Alfani et al., 2005; De Nicola et al., 2005; Xiang et al., 2005; Szczepaniak et al., 2006; Rossini e Mingorance, 2006; Klos et al., 2007; Blasco et al., 2008)

L'utilizzo di muschi e licheni nel biomonitoraggio è legato al fatto che essi sono privi di radici e di cuticola, quindi dipendono dalle deposizioni secche e umide per l'apporto di minerali (Giordano et al., 2005), sebbene vi possa essere un minimo contributo derivante dal substrato (Prussia e Killingbeck, 1991; Kuik e Wolterbeek, 1995). Essi inoltre hanno un elevato rapporto superficie/volume e non subiscono variazioni morfologiche durante l'accrescimento (Giordano et al., 2005).

L'efficienza di bioaccumulo di muschi e licheni deriva quindi essenzialmente da meccanismi passivi dovuti all'intrappolamento del particolato: gli inquinanti, quali i metalli (Giordano et al., 2005) e gli IPA, infatti, possono essere trattenuti col particolato intrappolato negli spazi intercellulari (Figueira et al., 2002) o sulle superfici non regolari (Jalkanen et al., 2000). Inoltre l'efficienza di bioaccumulo di elementi in traccia è da attribuire alla considerevole capacità di scambio cationico, dovuta sia al fatto che i costituenti delle pareti cellulari (principalmente acidi carbossilici) sono carichi negativamente e possono creare legami ionici con cationi in forma solubile (Figueira et al., 2002), sia alle attività biochimiche delle membrane plasmatiche o del citoplasma (Giordano et al., 2005). L'efficienza della ritenzione dei metalli dipende dal numero e dalla natura dei siti di legame extracellulari, dall'età dei tessuti e dalle condizioni di crescita (Brown e Bates, 1990).

Molto spesso, a causa dell'assenza di specie idonee di muschi e licheni in ambienti urbani ed extraurbani, per monitorare la deposizione di inquinanti questi organismi vengono esposti in bag (Wegener et al., 1992; Viskari et al., 1997; Jalkanen et al., 2000).

Sebbene il metodo delle bag non sia standardizzato rispetto alla quantità di materiale da utilizzare, alla durata dell'esposizione, alla relazione tra deposizione di particolato e modalità di intercettazione, esso presenta una serie di vantaggi in quanto fornisce informazioni integrate rispetto al tempo di esposizione (Spagnuolo et al., 2009), senza subire l'influenza di momentanee variazioni di presenza di inquinanti (Giordano et al., 2005).

Diversi studi (Adamo et al., 2003; Vingiani et al., 2004) hanno chiaramente mostrato che sia in muschi che in licheni esposti in bag, l'intercettazione dei metalli risulta fortemente influenzata dalle precipitazioni e dall'umidità dell'aria e che, nonostante i danni cellulari subiti dai due biomonitor

durante l'esposizione nelle bag entrambi gli organismi sono in grado di intercettare e accumulare gli elementi presenti in atmosfera (Giordano et al., 2005).

La maggior parte degli studi di biomonitoraggio che utilizzano muschi e licheni riguarda gli elementi in traccia (es. Berg and Steinnes, 1997; Bargagli et al., 1999; Freitas et al., 2000; Loppi and Bonini, 2000; Szczepaniak e Biziuk, 2003) ancora pochi sono gli studi che usano questi organismi per il monitoraggio degli IPA (es. Gerdola et al., 2002; Ötvösa et al., 2004; Blasco et al., 2008).

Muschi e licheni sono ampiamente utilizzati anche come bioindicatori passivi per il biomonitoraggio delle aree in cui sono naturalmente presenti (Steinnes et al., 1992; Fernández et al., 1997; Ötvösa et al., 2004; Klos et al., 2007). In questo caso è possibile riconoscere una serie di modificazioni anatomiche, fisiologiche e morfologiche in presenza di fenomeni di inquinamento, nonché declino della diversità di specie (Giordano et al., 2005; Klos et al., 2007).

Per le piante superiori, negli studi di biomonitoraggio della qualità dell'aria, si utilizzano soprattutto le foglie che, essendo sede degli scambi gassosi, risultano più esposte agli effetti degli inquinanti e di questi sono anche sito di accumulo (Bullini et al., 1998), inoltre esse sono particolarmente utili per rilevare inquinanti presenti in piccole concentrazioni o solo per periodi limitati (Alfani et al., 2000).

Sebbene non esista una relazione quantitativa tra le concentrazioni di metalli e IPA in aria e nelle foglie, le concentrazioni di questi inquinanti misurate nelle foglie riflettono i gradienti di contaminazione misurati in aria (Alfani et al., 1989, Calamari et al., 1991; Tremolada et al., 1996; Lodovici et al., 1998; Monaci et al., 2000; Alfani et al., 2001; 2003; Lehndorff e Schwark, 2004).

In generale, infatti, le foglie assorbono i composti gassosi e accumulano il particolato (e gli inquinanti ad esso legati) per intercettazione, impatto o sedimentazione (De Nicola et al., 2008) e tali meccanismi sono influenzati dalla morfologia (Smith, 1981), dall'età delle foglie (Howsam et al., 2000), dalla rugosità e dall'integrità della cuticola (Neinhuis e Barthlott, 1997). Inoltre è importante la composizione chimica delle cere cuticolari ed epicutcolari (Kömp e McLachlan, 1997) che giocano un ruolo importante nell'assorbimento dei composti lipofili come gli IPA (Simonich e Hites, 1994). Nell'intercettazione e nell'accumulo dei contaminanti un ruolo chiave è svolto anche dalla presenza di peli sulla pagina inferiore delle foglie (Howsam et al., 2000) che incrementano la superficie fogliare e favoriscono la ritenzione del particolato (Rauret et al., 1994; Bakker et al., 2000).

Il contenuto di elementi nelle foglie dipende non solo dall'assorbimento diretto attraverso gli stomi e dalla deposizione sulla superficie fogliare (De Nicola et al., 2008), ma anche dall'assorbimento

radicale e dalla traslocazione (Zimcka and Stackurski,1994). Il contributo di ogni singolo meccanismo all'accumulo fogliare è anche funzione dell'elemento considerato. Comunque, sebbene ancora non siano state completamente chiarite le relazioni tra deposizione atmosferica e contenuto fogliare di elementi in traccia, le foglie sono in grado di evidenziare trend spaziali di contaminazione tra siti a diverso impatto.

Gli IPA presenti in atmosfera costituiscono la principale fonte di IPA per le piante (Simonich e Hites, 1995). Questi composti, a seconda delle loro proprietà fisico-chimiche si accumulano tramite ripartizione all'equilibrio, deposizione in fase di vapore e in fase particolata (Welsch-Pausch et al., 1995; McLachlan, 1999). Gli IPA a basso peso molecolare in condizioni di intensa irradianza ed elevata temperatura possono subire processi di volatilizzazione e degradazione (Horstmann e McLachlan, 1998; Bakker et al., 2001) e, pertanto, poco influiscono sull'accumulo totale (De Nicola et al., 2008 essi possono però penetrare facilmente attraverso lo strato cuticolare della superficie fogliare e raggiungere i tessuti più interni della foglia (Kuhn et al., 1998). Al contrario, gli IPA a più alto peso molecolare, associati al particolato atmosferico, vengono depositati sulla superficie fogliare per poi essere più facilmente allontanati dalle piogge o dal vento (Edwards, 1983; Horstmann & McLachlan, 1998).

Il trasporto di questi xenobiotici dalle radici alle foglie è fonte di dibattito in letteratura: a causa della loro elevata lipofilità e bassa solubilità, gli IPA possono essere assorbiti dall'epidermide delle radici ma il trasporto può essere limitato (Jones et al., 1989; Wild et al., 1992; Kipopoulou et al. 1999). Al diminuire del peso molecolare aumenta la solubilità di questi composti, pertanto le maggiori difficoltà di trasporto si possono avere in particolare per gli IPA a medio e alto peso molecolare (Peijnenburg et al., 2005).

OBIETTIVO DEL LAVORO

Questa ricerca è parte integrante di un Progetto di Ricerca Nazionale (Prin 2007) dal titolo “*Emissione, trasporto, deposizione e monitoraggio di contaminanti da traffico veicolare. Effetti sulla biodiversità ed il funzionamento di leccete mediterranee*”. Tale progetto ha coinvolto diverse unità di ricerca: il Dipartimento di Chimica e Biologia dell’Università degli Studi di Salerno, i Dipartimenti di Biologia Strutturale e Funzionale e di Ingegneria Chimica dell’Università degli Studi di Napoli “Federico II”, l’Istituto Motori (CNR) di Napoli e il Dipartimento di Scienze Ambientali dell’Università degli Studi di Siena.

Nell’ambito dell’intero progetto di ricerca, il presente lavoro di dottorato ha riguardato, in particolare, la valutazione di *gradienti di contaminazione da metalli in traccia e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in leccete mediterranee e lo studio del metabolismo e della biodiversità delle comunità del suolo*.

La qualità del sistema suolo dipende dall’equilibrio di una serie di parametri chimici, fisici e biologici, che può essere alterato in seguito a fenomeni di contaminazione. Per monitorare lo stato di salute del suolo sono stati proposti diversi indicatori e tra questi sempre più spesso si fa riferimento alle comunità microbiche, vista la capacità di rispondere rapidamente ai cambiamenti ambientali. Inoltre, data l’importanza dei microrganismi nel ciclo della materia, qualsiasi effetto dell’inquinamento su questi ultimi può riflettersi sullo sviluppo della vegetazione, sulla produttività e su altre importanti funzioni ecosistemiche. Gli indicatori microbici possono basarsi sulla diversità strutturale o funzionale della comunità microbica e le misure dei parametri microbiologici, come respirazione del suolo, biomassa o attività enzimatiche, possono fornire informazioni sull’abbondanza e l’attività dei microrganismi così come sugli effetti dell’inquinamento sulle attività metaboliche.

Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, in sistemi caratterizzati da copertura a leccio e da un diverso grado di impatto antropico, la deposizione di elementi in traccia e di idrocarburi policiclici aromatici e gli effetti sulla struttura e sull’attività delle comunità microbiche del suolo.

Lo studio condotto in due regioni, la Campania con clima mediterraneo e la Toscana che ricade in una zona climatica più tipicamente temperata, ha avuto per obiettivo anche la valutazione dell’influenza del clima sul metabolismo delle comunità microbiche e quindi sulle attività che determinano la decomposizione della sostanza organica che si accumula al suolo con la lettiera.

A tale scopo sono stati valutati i gradienti di contaminazione mediante l’uso di foglie di *Quercus ilex* (leccio), una quercia sempreverde tipica di area mediterranea, ampiamente utilizzata in studi di biomonitoraggio. Le foglie del leccio, infatti, per la loro peculiare morfologia, costituiscono una

delle più efficienti superfici di intercettazione di inquinanti atmosferici e sono state largamente impiegate come bioaccumulatori di metalli ed IPA.

Nei suoli oggetto dello studio, individuati in Campania e in Toscana, sono stati determinati alcuni indicatori microbici ampiamente utilizzati dagli ecologi del suolo per valutare gli effetti di vari fattori ambientali, naturali o antropici, sul sistema edafico. Inoltre, i suoli sono stati caratterizzati per una serie di parametri chimico-fisici, che sono stati poi messi in relazione con i risultati del biomonitoraggio e con gli indicatori microbici.

MATERIALI E METODI

Aree di studio

Il presente studio è stato condotto in leccete della Campania e della Toscana caratterizzate da un diverso grado di antropizzazione: in particolare, in ciascuna regione, sono stati individuati un sito urbano, uno periurbano e uno remoto.

In Campania sono stati selezionati il Parco di Capodimonte (NA) come sito urbano, il Cratere degli Astroni (NA) come sito periurbano e Ottati (SA) come sito remoto; per la Toscana, il Parco di Villa Patrizia (SI), Belcaro (SI) e Cala Violina (GR), rispettivamente come sito urbano, periurbano e remoto.

I due siti urbani sono rappresentati da parchi localizzati in prossimità di una strada ad elevato flusso di traffico veicolare e in ciascuno di essi è stato definito un transetto individuando tre aree a distanza crescente dalla strada.

Nei grafici e nelle immagini che seguono, le lettere C e T indicano le due regioni (rispettivamente Campania e Toscana), i numeri 1, 2, 3 le aree di campionamento disposte lungo i transetti urbani (dal punto più vicino alla strada a quello più lontano), il numero 4 il sito periurbano e il 5 il sito remoto.

Parco di Capodimonte (NA)

Il Parco di Capodimonte (figura 4) è una delle aree verdi più grandi di Napoli. Si estende su una superficie di circa 130 ettari, su un substrato di tufo ricoperto da piroclastiti sciolti ed è popolato da oltre 400 specie di piante. Il bosco costituiva la riserva di caccia voluta da Carlo III di Borbone nel 1734 e circonda l'omonima reggia, oggi sede di un museo nazionale. Il piano originario del parco fu opera dell'architetto Ferdinando Sanfelice e l'impianto delle specie arboree era adeguato ai diversi tipi di selvagginia destinati a popolarlo. Il Parco era un luogo di svago ma anche un'azienda agricola dove era possibile acquistare il legname ricavato dal taglio dei boschi e le produzioni provenienti dall'Orto reale. Il botanico Dehnardt arricchì, intorno alla metà del XIX secolo, il Parco di nuove specie arboree, anche esotiche. Nel bosco si possono ammirare tuttora olmi, querce, tigli, castagni, cipressi, pini, lecci. Solo nel 1928 il Parco divenne demanio dello Stato per poi essere aperto al pubblico nel 1950, in seguito all'acquisizione dello status di "Parco".



Figura 4: Veduta aerea del Parco di Capodimonte (NA) con le tre aree di campionamento C1, C2 e C3 lungo il transetto..

Le tre aree del transetto (C1, C2, C3) presentano lecci con una circonferenza media di 180 cm. Questo parametro indica che si tratta di piante adulte e quindi presenti da molti anni. Il sottobosco è caratterizzato in prevalenza da edera e pungitopo.

🚩 Cratere degli Astroni (NA)

Il Cratere degli Astroni (figura 5) è parte del complesso vulcanico di Agnano e della più grande caldera dei Campi Flegrei. E' situato al limite occidentale della città di Napoli nel cui comune sono inclusi solo l'ingresso alla riserva e i versanti settentrionali esterni al cratere: la maggior parte dell'area ricade nel territorio comunale di Pozzuoli.

Ferdinando D'Aragona nel '400 destinò l'area a riserva reale di caccia e, durante la seconda guerra mondiale quest'ultima fu utilizzata come deposito per le armi. Attualmente il cratere è un'oasi del WWF gestita in convenzione con il Ministero dell'Ambiente e la Regione Campania e, nel 1987 è divenuto Riserva Naturale Statale. Ha un'estensione di 247 ettari e si presenta con una forma a caldera ellittica, con l'asse maggiore di circa 2,0 km disposto secondo la direzione est-ovest e l'asse minore di circa 1,6 km. La parte centrale presenta una vasta depressione al cui interno vi sono alcuni rilievi e una ricca vegetazione costituita prevalentemente da bosco misto deciduo e foresta di sclerofille sempreverdi. Data la sua particolare morfologia e la presenza di tre laghi sul fondo (localizzati a 10 m sotto il livello del mare e nei quali vi sono flora e fauna caratteristiche), il cratere mantiene un tasso di umidità alquanto elevato che causa l'instaurarsi di un fenomeno raro chiamato "inversione vegetazionale". Quest'ultimo consiste nella singolare successione di specie vegetali e ambienti lungo un gradiente altitudinale, inversa rispetto a quella usuale. Sul fondo del cratere, a

causa della maggiore umidità e della minore insolazione, crescono specie mesofile tipiche di quote più alte (quali ad esempio castagno, rovere, farnia, carpino, olmo); nella fascia superiore e all'esterno del cratere si ha dominanza delle sclerofille (tra cui leccio, mirto, lentisco, ligustro).

L'area dove è stato effettuato il campionamento, C4, presenta un leccio secolare con una circonferenza di circa 4 m e altri lecci con circonferenza di 110 cm. Il sottobosco è costituito in prevalenza di edera e pungitopo.



Figura 5: Veduta aerea del Cratere degli Astroni (NA) con l'area di campionamento C4.

Ottati (SA)

Il sito remoto per la Campania (figura 6) è una lecceta situata nella parte nord-orientale del Parco Nazionale del Cilento e del Vallo di Diano, alle pendici meridionali dei monti Alburni, lontana da fonti dirette di emissione di inquinanti. L'area interessata dal campionamento ha una pendenza di 55°. Il territorio è in buona parte costituito da montagne ricche di boschi, dove ritroviamo la macchia mediterranea con prevalente copertura a leccio.

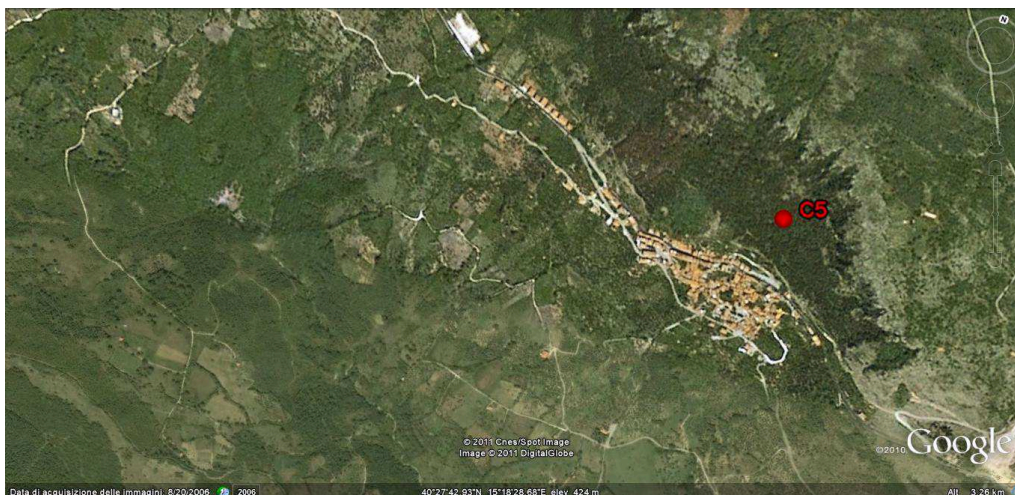


Figura 6: Veduta aerea della lecceta di Ottati (SA) con l'area di campionamento C5.

📍 **Parco di Villa Patrizia (SI)**

Villa Patrizia (figura 7) è il parco di una villa privata (oggi adibita a hotel) costruita intorno alla metà dell'800, quando l'allora ministro della guerra la volle come residenza privata. Il parco è situato alla periferia di Siena, a 325 m s.l.m. e presenta un suolo che deriva da depositi marini (sabbie, argille e calcareniti) risalenti al Pliocene.



Figura 7: veduta aerea del Parco di Villa Patrizia (SI) con le tre aree di campionamento T1, T2 e T3 lungo il transetto.

📍 **Belcaro (SI)**

La lecceta di Belcaro (figura 8) è sita in località Petriolo (SI) a ridosso della superstrada SI-GR. Situata a 250m s.l.m., presenta un suolo derivante da rocce di origine metamorfica. I campionamenti sono stati effettuati in prossimità dell'omonimo castello, un tempo borgo medievale poi divenuto villa di campagna.



Figura 8: veduta aerea della lecceta di Belcaro (SI) con l'area di campionamento.

🚩 Cala Violina (GR)

La lecceta di Cala Violina (figura 9) si trova nel Parco Interprovinciale di Montioni e si estende su due Province diverse: Grosseto (per una superficie di 2048 ettari) e Livorno (1229 ettari). Il bosco è un misto di latifoglie decidue a prevalenza di cerro e ceduo e di sclerofille sempreverdi. Il sottobosco è ricco di cespugli della macchia mediterranea, quali mirto, cisto di Montpellier, lavanda selvatica, ginestra, erica e corbezzolo. La lecceta di Cala Violina si trova a circa 50 m di quota e a 1 km dal mare ed è un sito inserito nel programma di Monitoraggio Integrato delle Foreste Toscane (MonITo).

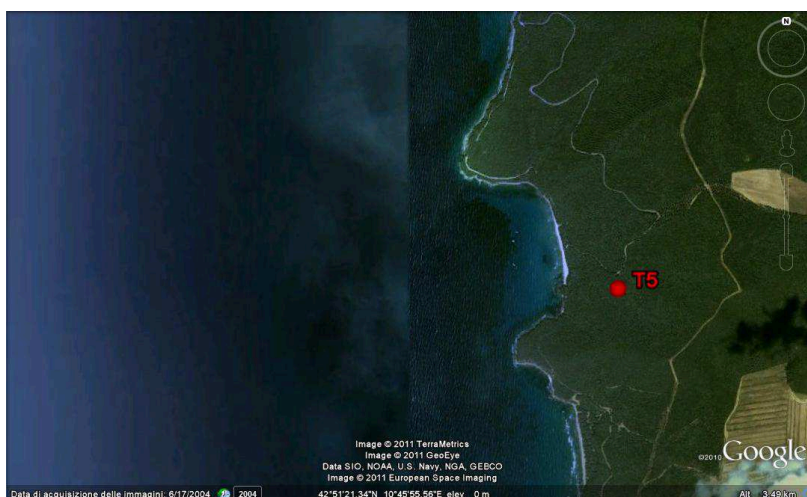


Figura 9: veduta aerea della lecceta di Cala Violina (GR) con l'area di campionamento.

➤ Differenze climatiche

Per una caratterizzazione del clima delle due regioni, sono stati riportati i climadiagrammi delle città di Napoli e di Siena relativi al trentennio 1961-2000 (figura 10). Mentre le temperature estive tra le due regioni sono confrontabili, quelle invernali risultano più basse in Toscana, inoltre per Napoli il periodo di aridità estiva è più lungo e di maggior grado e la piovosità più elevata in autunno. Queste differenze nel clima delle due regioni studiate possono influenzare le dinamiche delle comunità microbiche.

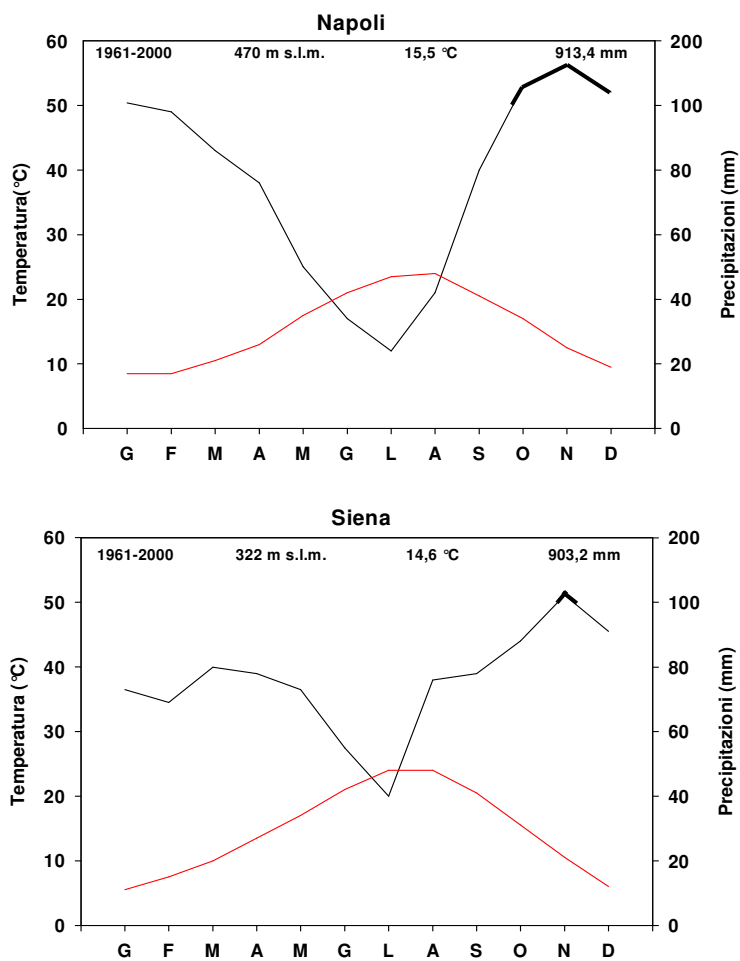


Figura 10: climadiagrammi delle città di Napoli e Siena, relativi al trentennio 1961-2000: in rosso la curva delle temperature, in nero quella delle precipitazioni.

➤ Il leccio

Il leccio (*Quercus ilex* L.) è una pianta arborea sempreverde, tipica degli stadi maturi della successione ecologica in ambiente mediterraneo (Barbero et al., 1992). Il leccio è ampiamente diffuso in tutto il bacino del Mediterraneo (Barbero et al., 1992) e si trova sia in aree naturali che antropizzate (Maisto et al., 2004); escludendo i terreni argillosi e compatti dai quali rifugge, si adatta a qualsiasi substrato.

Il leccio può assumere portamento arbustivo o arboreo, raggiungendo in quest'ultimo caso anche i 20 m di altezza. Viene annoverato tra le sclerofille, ovvero tra quelle specie che hanno sviluppato adattamenti tali da poter resistere alle particolari condizioni climatiche dell'ambiente mediterraneo (estati calde e aride e inverni miti). Il comportamento ecofisiologico di questa specie viene definito di "evitamento della siccità" e di "risparmio di acqua", in quanto questa pianta ottimizza il tasso di assimilazione e di traspirazione mediante il controllo dell'apertura e chiusura degli stomi (Acherar et al., 1991; Rambal, 1992; Manes et al., 1997) e regola osmoticamente l'acqua presente nei vacuoli (cf. Levitt, 1980).

Le foglie mostrano una serie di caratteristiche peculiari quali: densità del mesofillo e scarsità di spazi intercellulari, abbondanza di tannini e metaboliti secondari e ricchezza di riserve di amido (Margaris, 1981). I tratti morfologici delle foglie possono inoltre presentare differenze a seconda del microclima (Gratani, 1996), della disponibilità di acqua (Sabaté et al., 1999) e della posizione lungo la corona della pianta, infatti quelle più esterne e poste più in alto hanno una più accentuata sclerofillia (Terradas e Savé, 1992). Esse possono vivere anche 3-4 anni, sono inoltre lanceolate, e presentano uno spesso strato di cuticola sulla pagina superiore e tricomi stellati sulla pagina inferiore (figura).

Le nuove foglie nascono a maggio e a settembre, evitando in questo modo i mesi estivi in cui vi sono le maggiori carenze di acqua (De Lillis e Fontanella, 1992). E' possibile, in funzione della posizione relativa lungo i rami, riconoscere e collezionare foglie di età definita (De Nicola et al., 2005) ottenendo in tal modo informazioni integrate nel tempo sulla deposizione atmosferica degli inquinanti. Infatti, lungo i rami, si susseguono nodi ed internodi con foglie di differente età, le più giovani nella parte più esterna e le più vecchie nella parte più interna dei rami (De Nicola et al., 2011a).

Le foglie del leccio, infatti, proprio per la loro peculiare morfologia, costituiscono una delle più efficienti superfici di intercettazione di inquinanti atmosferici e sono state largamente impiegate come bioaccumulatori di metalli ed IPA (Alfani et al., 2000; Monaci et al., 2000; Bargagli et al., 2003; De Nicola et al., 2005; Alfani et al., 2005; Orecchio, 2007).



Figura 11: Una pianta di leccio, in particolare le pagine superiori ed inferiori delle foglie e i tricomi stellati al microscopio.

➤ **Campionamenti di foglie e suolo**

Ciascuna area di campionamento, sia quelle disposte lungo i transetti nei parchi urbani, sia nei boschi periurbani e nei siti remoti, è stata suddivisa in quattro sub-aree.

Per ciascuna delle 4 sub-aree, sono stati selezionati 6 alberi di leccio. A maggio 2009, nel periodo immediatamente precedente alla comparsa dei nuovi germogli, da ciascun albero, lungo la chioma, ad almeno 1,5 m dal suolo, sono state prelevate foglie sane di un anno di età, unite a formare un pool composito omogeneo. Alla base dei lecci selezionati in ciascuna delle sub aree, a maggio e novembre 2009 sono state prelevate 8 carote di suolo nello strato 0-5 cm (dopo aver allontanato la lettiera), poi unite a formare un unico campione composito omogeneo. Contestualmente in ciascuna sub-area sono stati prelevati campioni per la determinazione della capacità idrica massimale (CIM), mediante carotatori cilindrici a banda stagnata.

Sia per le foglie che per il suolo, i campioni provenienti da ciascuna sub-area sono stati trattati e analizzati separatamente. Questa modalità di campionamento ha consentito di ottenere un campione rappresentativo di ciascuna sub-area, senza perdere l'informazione legata alla variabilità spaziale di ciascuna area di campionamento.

Al fine di ottenere una più completa caratterizzazione delle aree di studio, in ciascuna di esse (fatta eccezione per i siti remoti) e sempre in prossimità dei lecci campionati è stata campionata una carota di suolo 20x20x20 cm della quale è stato osservato il profilo. Il riconoscimento del colore dei

vari orizzonti del profilo è stato effettuato con l'ausilio di tavole Munsell. Inoltre per evidenziare la presenza di carbonati è stata valutata l'effervescenza mediante aggiunta di HCl al 10%. Utilizzando uno stereomicroscopio (SMZ645, Nikon), successivamente in laboratorio, si sono fatte osservazioni per valutare la presenza di pallottole fecali allo scopo di avere un'idea dell'abbondanza di artropodi.

➤ **Trattamento dei campioni di foglie e analisi di laboratorio**

In laboratorio, le foglie sono state private del picciolo e sono state delicatamente pulite, così da rimuovere ragnatele o piccoli insetti dalla superficie, e sono state poi suddivise per le successive analisi. Parte delle foglie è stata conservata a -20°C per la successiva analisi degli IPA, parte è stata seccata in stufa a 75°C fino al raggiungimento del peso costante, per la determinazione del tenore idrico per via gravimetrica, e un'altra aliquota è stata utilizzata per la determinazione delle concentrazioni degli elementi.

Determinazione della concentrazione di nutrienti ed elementi in traccia

Le foglie sono state polverizzate manualmente in un mortaio di porcellana in azoto liquido e poi seccate in stufa a 75°C. 250 mg di materiale secco polverizzato sono stati mineralizzati mediante aggiunta di 4 ml di acido nitrico (65%) e 2 ml di acido fluoridrico (50%), secondo quanto riportato da Baldantoni e collaboratori (2009).

La mineralizzazione è stata effettuata in un digestore a microonde (Ethos, Milestone), utilizzando un programma costituito da 6 step:

1. 1 minuto a 250 W
2. 1 minuto a 0 W
3. 5 minuti a 250 W
4. 4 minuti a 400 W
5. 4 minuti a 600 W
6. 5 minuti a 250 W

Successivamente le soluzioni ottenute, sono state portate a volume di 50 ml con acqua distillata.

Le concentrazioni di Fe, K, Na, Mg, Mn e Zn nei campioni di foglie sono state determinate mediante spettrometria ad assorbimento atomico, con atomizzazione alla fiamma (AAnalyst 100, Perkin Elmer), Ca, Cd, Cr, Cu, Ni, e Pb sono state determinate mediante ICP-OES (Optima 7000DV, PerkinElmer) sugli stessi campioni mineralizzati.

Le concentrazioni di C e N sono state determinate sul materiale secco e polverizzato, mediante un analizzatore CHNS-O (Flash EA 111, Thermo).

Per valutare l'affidabilità delle metodiche utilizzate, contestualmente ai campioni di foglie, è stato analizzato in tre repliche, uno standard di riferimento certificato (Standard Reference Material 1515 Apple Leaves; NIST, 1991). I risultati ottenuti dall'analisi dello standard di riferimento certificato sono stati utilizzati per la correzione delle concentrazioni degli elementi nei campioni di foglie.

Determinazione della concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici

Nel presente studio sono stati determinati IPA a da 2 a 6 anelli aromatici. In tabella 4 sono riportati i composti determinati e la cancerogenicità ad essi associata (IARC, 2011).

IPA determinati e cancerogenicità associata	
Acenaftilene	n.c.
Acenaftene	3
Fluorantene	3
Fenantrene	3
Antracene	3
Fluorene	3
Pyrene	3
Benzo[<i>a</i>]antracene	2b
Crisene	2b
Benzo[<i>b+k+j</i>]fluorantene	2b
Benzo[<i>e</i>]pirene	3
Benzo[<i>a</i>]pirene	1
Perylene	3
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	2b
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	2a
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	3
Dibenzo[<i>a,e</i>]pirene	3
Coronene	3
Dibenzo[<i>a,h</i>]pirene	2b
Dibenzo[<i>a,i</i>]pirene	2b
Dibenzo[<i>a,l</i>]pirene	2a

Tabella 4: Idrocarburi policiclici aromatici analizzati e loro classificazione secondo quanto riportato dallo IARC (2011): cancerogeni per l'uomo (1), probabili cancerogeni per l'uomo (2a), possibili cancerogeni (2b), non classificabili come cancerogeni per l'uomo (3). n.c.=IPA non classificati dallo IARC.

L'estrazione di IPA dalle foglie è stata condotta mediante sonicazione (XL2020, Misonix) in miscela diclorometano e acetone (1:1 = v/v), come proposto da De Nicola e collaboratori (2005). In particolare, 5 g di materiale fresco, addizionati con una pari quantità di sodio solfato anidro, per eliminare la possibile interferenza con acqua, sono stati sottoposti ad una prima sonicazione in 100 ml di miscela, poi filtrati sottovuoto e sottoposti ad altre due successive sonicazioni, aggiungendo ogni volta 100 ml di miscela. Ciascuna sonicazione è stata effettuata in modalità pulsata per 3 minuti, per evitare il surriscaldamento del campione. Gli estratti ottenuti, 300 ml complessivi, per

ciascun campione, sono stati ridotti a un volume di circa 4 ml mediante un evaporatore rotante, filtrati (con filtri in PTFE da 0,2 µm) e portati a secco sotto flusso di azoto. Successivamente, dopo l'aggiunta di 0,4 ml di una mix di 4 standard interni deuterati (acenaftilene D8, fluorantene D10, benzo (k) fluorantene D12, benzo (g,h,i) perilene D12) a concentrazione di 1 µg/ml, il campione è stato portato ad un volume finale di 4 ml con cicloesano.

Le concentrazioni degli IPA nei campioni sono state determinate per gas cromatografia (HP 5890) accoppiata alla spettrometria di massa (HP 5971A).

L'analisi è stata condotta su 1 µl di campione prelevato ed iniettato manualmente in modalità *on-column* in una colonna HP-5MS, lunga 30 m, con diametro interno di 0,25 mm, e con spessore del film di 0,25 µm e rapporto di fase 250. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio mantenuto in condizioni di flusso costante di 1,12 ml/min. La temperatura del forno è stata programmata in modo da seguire una rampa lineare da 70°C a 280°C, con uno step di 20°C al minuto rimanendo a regime costante per 9 minuti, e un successivo step di 20°C al minuto fino al raggiungimento di 310°C, rimanendo a regime costante per 7 minuti. L'iniettore è stato programmato in modo che la temperatura fosse 3°C superiore a quella del forno (modalità *oven track*) e con una pressione iniziale in testa alla colonna di 70 KPa a 70°C. L'acquisizione dei dati è stata svolta in modalità SIM (*selected ion monitoring*).

Per l'analisi quantitativa dei singoli IPA è stato utilizzato il metodo dello standard interno.

Le curve di calibrazione, per ogni singolo idrocarburo analizzato, sono state costruite considerando il rapporto tra le risposte strumentali degli standard (Dr. Ehrenstorfer Mix 45 and Mix 183) a 5 livelli di concentrazione (1,00; 0,50; 0,10; 0,05; 0,01 ng/l) e dello standard interno.

Per poter valutare le perdite durante l'intero processo di estrazione, a monte della prima sonicazione sono stati aggiunti 0,25 ml di standard deuterati (acenaftene D10, fenantrene D10, crisene D12 e perilene d12) a concentrazione nota (1µg/ml) e le percentuali di recupero usate per la correzione delle concentrazioni degli IPA analizzati. Le concentrazioni di IPA sono state riferite al peso secco delle foglie, dopo essiccazione in stufa a 75°C fino a raggiungimento del peso costante.

La concentrazione minima rilevabile è stata calcolata nel range 0,001 – 0,003 ng/µl, secondo l'IPA considerato.

➤ **Trattamento dei campioni di suolo e analisi di laboratorio**

In laboratorio, il suolo è stato setacciato con un crivello in acciaio a maglie di 2 mm così da eliminare residui di foglie, radici, organismi della mesofauna e lo scheletro del suolo.

Completata questa operazione, la porzione granulometrica del suolo è stata in parte essiccata all'aria per la determinazione degli IPA, in parte seccato in stufa a 75°C per la determinazione di pH, sostanza organica ed elementi, come totale e come frazione disponibile; un'altra aliquota è stata conservata in frigorifero a 4°C per effettuare le analisi biologiche e la restante porzione congelata a -20°C per la determinazione del contenuto di ergosterolo e per il profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA).

➤ **Caratterizzazione dei parametri chimico-fisici**

CIM, Tenore idrico, sostanza organica e pH

I suoli sono stati caratterizzati per una serie di parametri chimico-fisici.

La capacità idrica massimale (CIM) è stata determinata con metodo gravimetrico. Carote di suolo indisturbate sono state portate a saturazione e, dopo aver lasciato drenare l'acqua gravitazionale, sono state pesate e poi essiccate in stufa a 105°C fino a peso costante. La CIM è stata espressa come quantità di acqua trattenuta contro la forza di gravità ed espressa come percentuale rispetto al peso secco.

Per la determinazione del tenore idrico un'aliquota di ogni campione setacciato è stata pesata prima e dopo essiccamento in stufa a 75°C per 48 h fino a peso costante, e il tenore idrico è stato espresso come percentuale di acqua rispetto al peso secco. La determinazione è stata effettuata su due repliche per campione. La determinazione di questo parametro ha consentito di poter riferire i risultati delle analisi biologiche al peso secco del terreno.

La sostanza organica è stata determinata, in duplice replica, mediante calcinazione in muffola (Controller B 170, Nabertherm) a 550°C per 4 ore.

Il contenuto di sostanza organica è stato determinato per perdita di peso ed espresso in percentuale del peso secco.

Il pH in acqua è stato determinato per via potenziometrica, aggiungendo a ciascun campione acqua distillata in rapporto 1:2,5 (v/v). Le misure sono state effettuate utilizzando un pH-metro (HI 4212, Hanna) munito di elettrodo di vetro (HI 1131, Hanna).

Concentrazione totale e frazione disponibile di nutrienti ed elementi in traccia

Per la determinazione della concentrazione totale degli elementi è stata seguita la stessa procedura di mineralizzazione adoperata per le foglie, partendo da campioni di suolo seccati in stufa e polverizzati con un mulino (PM4, Retsch), munito di mortai e biglie di agata, per escludere ogni possibilità di contaminazione dei campioni da metalli.

La determinazione della concentrazione della frazione disponibile degli elementi è stata effettuata su estratti di suolo, precedentemente seccato in stufa, ottenuti con metodi differenti, in funzione degli elementi da determinare e del pH del campione di suolo (Izza *et al.*, 1994). Per l'estrazione della frazione disponibile di Cd Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn è stato utilizzato il metodo di Lindsay e Norvell (1978) per i terreni con pH in acqua superiore a 6,5. Questo metodo prevede l'estrazione mediante una soluzione tamponata a pH $7,3 \pm 0,05$ a base di DTPA (acidodietilentriamminopentacetico), calcio cloruro e trietanolammina. Per i terreni con pH in acqua inferiore a 6,5 è stato invece, utilizzato il metodo Läkanen e Erviö (1971), che prevede l'estrazione mediante una soluzione tamponata a pH $4,65 \pm 0,05$ a base di EDTA (acido etilendiamminotretacetico) e ammonio acetato.

Per la determinazione delle basi di scambio (Mg, Na, Ca e K) i campioni sono stati trattati con una soluzione estraente a base di bario cloruro e TEA (trietanolammina), secondo la metodica di Goldberg e Farini (1994).

La concentrazione di elementi totali e della relativa frazione disponibile è stata determinata quantitativamente per AAS and ICP come precedentemente descritto per le foglie.

Anche per il suolo, come per le foglie, contestualmente ai campioni, è stato analizzato (in tre repliche) materiale di riferimento certificato utilizzato per la correzione delle concentrazioni di elementi nei campioni di suolo. In particolare, sono stati utilizzati i materiali certificati NCS DC73321 Soil (China National Analysis Center for Iron & Steel, 2008) e BCR 700 (European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements, 2001), rispettivamente per la concentrazione totale e la frazione disponibile.

Concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici

Campioni di 30 g di terreno essiccato all'aria sono stati utilizzati per l'estrazione degli IPA dal suolo. La procedura di estrazione e la determinazione quantitativa è analoga a quella descritta precedentemente per le foglie. Le concentrazioni finali sono espresse come ng/g di peso secco del campione.

➤ **Parametri biologici: significato ecologico e metodi analitici**

I microrganismi del suolo possono costituire una buona opportunità per comprendere le risposte di questo sistema allo stress e al disturbo, data l'importanza delle attività biologiche in numerosi processi ecosistemici (Wardle e Giller, 1996). In particolare, i microrganismi stando a stretto contatto col suolo, sono considerati i migliori indicatori della contaminazione di questo sistema (Klimkiewicz-Pawlas e Maliszewska-Kordybach, 2002). Essi sono infatti molto sensibili alle perturbazioni e a basse concentrazioni di contaminanti, pertanto la risposta è rapida (Torstensson, 1997; Pankhurst et al., 1998; Wetzel, 1998; Riepert e Wilke, 1999; Avidano et al., 2005). Essa può manifestarsi mediante un'alterazione della diversità e dell'attività metabolica (Schloter et al., 2003), nonché attraverso una riduzione del numero di specie e una modificazione della struttura della comunità (Avidano et al. 2005; Shi et al. 2005); tali risposte si possono avere anche simultaneamente.

Un indicatore microbico può essere definito come “un parametro microbico che rappresenti le proprietà dell'ambiente o l'impatto sull'ambiente, la cui interpretazione fornisce informazioni che vanno al di là del significato del parametro stesso” (Nielsen et al., 2002). I bioindicatori microbici possono essere basati sulla diversità funzionale e strutturale della comunità microbica (Avidano et al., 2005), o sul tasso di alcuni processi biochimici. Nell'ambito della diversità funzionale, il pattern di utilizzo del carbonio e le misure di attività enzimatica (Martinez-Salgado et al., 2010) relative all'intera comunità (Nielsen et al., 2002), nonché misure di respirazione, biomassa microbica (Brohon et al., 2001; Eibes et al., 2006) sono molto utili per comprendere lo stato di salute del suolo.

Senza dubbio, per avere un quadro chiaro e quanto più possibile esaustivo è necessario misurare molteplici parametri, considerare diversi indicatori e valutare le relazioni tra essi.

Biomassa microbica

Il termine “biomassa microbica del suolo” (SMB) è usato per descrivere l'insieme dei microrganismi presenti nel suolo (Brookes, 1995) e comprende sia gli organismi dormienti che quelli metabolicamente attivi (Schloter et al., 2003). L'importanza della SMB per il funzionamento del sistema suolo è ampiamente riconosciuta (Dalal, 1998; Franzluebbers et al., 1999; Stockdale e Brookes, 2006) ed a causa del rapido turnover dei microrganismi, rappresenta un indicatore sensibile delle variazioni delle proprietà fisico-chimiche del suolo e della presenza di inquinanti, quali i metalli, per effetto dei quali la sua abbondanza può essere ridotta (Fritze et al., 1996). Pertanto, elevati valori di biomassa microbica indicano l'esistenza di condizioni, attuali o pregresse, favorevoli allo sviluppo dei microrganismi (Florenzano, 1989), mentre valori bassi possono essere

determinati da stress o perturbazioni ambientali. Generalmente, la biomassa microbica nel suolo rispecchia il contenuto di sostanza organica, con un rapporto carbonio microbico/carbonio organico compreso in media tra l'1 ed il 5% in peso (Sparling, 1985); rispetto alla sostanza organica però la SMB è ritenuta un indicatore più sensibile dei cambiamenti delle proprietà del suolo (Powlson e Jenkinson, 1976).

La biomassa microbica è stata determinata come contenuto di carbonio microbico mediante il metodo della fumigazione-estrazione (Vance et al. 1987). Il principio del metodo si basa sull'assunzione che i vapori del fumigante determinano la lisi cellulare e conseguentemente il rilascio del materiale citoplasmatico. In capsule Petri di vetro sono stati pesati 8 g di suolo fresco per ciascun campione, ai quali è stata aggiunta una quantità d'acqua tale da portarli al 50% della capacità di ritenzione idrica. Le capsule con il suolo sono state poste in un essiccatore da vuoto foderato con un foglio di carta da filtro imbevuto d'acqua (per prevenire la disidratazione del suolo) insieme ad un beker con 50 ml di cloroformio purificato. Dopo un'adeguata sigillatura, mediante una pompa è stato praticato il vuoto nell'essiccatore fino ad ottenere l'ebollizione del cloroformio (lasciato bollire per 2 min così da saturare l'atmosfera dell'essiccatore). L'essiccatore è stato poi incubato al buio a 25°C per 24 ore e, al termine di questo periodo, i vapori di cloroformio sono stati allontanati effettuando ripetuti cicli di aerazione.

I campioni sono stati quindi sottoposti ad estrazione del carbonio con 32 ml di una soluzione acquosa 0,5 M di K_2SO_4 , in modo da avere un rapporto suolo/estraente 1:4, in agitazione per 30 minuti. In parallelo l'estrazione è stata effettuata anche sui suoli non fumigati.

Gli estratti di suolo, fumigati e non fumigati, sono stati filtrati con filtri Whatman 42 ed il contenuto di carbonio organico negli estratti è stato determinato mediante analizzatore TOC Shimadzu V-CNS a combustione catalitica con catalizzatore al platino e dotato di detector ad infrarosso. La soluzione di K_2SO_4 non è in grado di estrarre il carbonio dalle cellule intatte pertanto la differenza nel contenuto di carbonio organico tra gli estratti ottenuti dai suoli fumigati e non fumigati, è attribuibile al materiale cellulare liberato in seguito alla lisi operata dal cloroformio.

Prima dell'analisi i campioni, previamente diluiti ($v/v = 1:10$) per proteggere la cella di combustione dall'eccesso di sali, sono stati sottoposti dall'analizzatore stesso ad allontanamento di carbonati e bicarbonati eventualmente presenti, mediante aggiunta di HCl e insufflazione di aria ultrapura (contenuto di idrocarburi e $CO/CO_2 < 1 \text{ mg/l}$).

Il contenuto della biomassa microbica è stato ricavato come:

$$B.M. = Ec/Kec$$

dove E_c è uguale al carbonio organico estratto dai suoli fumigati – il carbonio organico estratto dai suoli non fumigati e K_{ec} è una costante pari a 0,45 (Wu et al., 1990; Joergensen, 1996).

Ergosterolo

I funghi svolgono importanti funzioni negli ecosistemi terrestri: essi infatti sono coinvolti, nel processo di decomposizione della sostanza organica (Paul e Clark, 1989), risultando, insieme ai batteri, i principali responsabili della degradazione e mineralizzazione dei composti organici e della produzione dell'humus. In più lo sviluppo dei miceli fungini contribuisce alla stabilizzazione degli aggregati di suolo (Tisdall e Oades, 1982) e l'instaurarsi di relazioni simbiotiche con le piante, favorendo i processi metabolici delle stesse (Harley, 1971).

Monitorare la biomassa fungina contribuisce pertanto a definire la qualità di un suolo.

L'ergosterolo è il più abbondante sterolo nella membrana cellulare dei funghi filamentosi (Weete, 1989), di alcune microalghe, protozoi e lieviti (Newell, 1992); in contrasto, piante e batteri ne contengono bassissime concentrazioni (Zhao et al., 2005). Esso si degrada rapidamente dopo la morte dell'ifa (Grant e West, 1986; Zhao et al., 2005), pertanto la concentrazione di ergosterolo nel suolo è considerata una valida stima della biomassa fungina viva (Grant e West, 1986). Inoltre, i funghi sono, dopo i batteri, gli organismi del suolo numericamente più abbondanti e costituiscono la frazione dominante in termini di biomassa, rappresentando ben il 70-80% in peso dell'intera biomassa microbica (Miller e Lodge, 1997); pertanto, il contributo di altri organismi al contenuto di ergosterolo del suolo è da ritenersi trascurabile.

Per l'estrazione dell'ergosterolo sono stati prelevati 2 g di terreno (conservato a -20°C e preventivamente scongelato) ai quali sono stati aggiunti 1 ml di cicloesano e 4 ml di una soluzione di KOH al 10% in metanolo.

I campioni sono stati sonicati per 15 minuti, successivamente portati a 70°C per 90 minuti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Mediante l'aggiunta di KOH si determina la saponificazione di tutti i lipidi estratti con l'ergosterolo, tranne che degli steroli. Questi ultimi possono venire estratti con un solvente idrofobico (cicloesano). Pertanto ai campioni sono stati poi addizionati 1 ml di acqua ultrapura e 2 ml di cicloesano.

In seguito a centrifugazione per 5 minuti a 3000 rpm è stata ottenuta la separazione di due fasi: la fase acquosa inferiore, all'interno della quale erano emulsionati i lipidi saponificati, e la fase superiore in cicloesano, contenente gli steroli. Quest'ultima è stata prelevata mentre per la frazione rimanente il procedimento di estrazione è stato ripetuto, aggiungendo altri 2 ml di cicloesano, in modo da incrementare la percentuale di recupero dell'analita.

Il cicloesano degli estratti è stato fatto evaporare a 40°C sotto flusso di azoto. Per poter procedere con le misure dell'ergosterolo, i campioni portati a secco sono stati disciolti in 1 ml di metanolo a 40°C per 15 minuti e filtrati mediante un filtro da 0,5 µm. La determinazione dell'ergosterolo estratto dai campioni è stata effettuata mediante HPLC (Finningan Surveyor, Thermo Scientific), dotato di colonna C18 a fase inversa e detector UV impostato a 282 nm. La fase mobile utilizzata è il metanolo, con flusso di 1 ml/minuto.

L'area del picco di interesse ha permesso la determinazione della concentrazione dell'analita grazie alla costruzione di una retta di calibrazione, per la quale sono stati utilizzati standard a concentrazioni note nell'intervallo 10-100 µg/l.

Attività idrolasica totale

Per valutare l'attività delle comunità microbiche molto frequente è l'uso di saggi enzimatici che sfruttano la capacità dei gruppi microbici di trasformare specifici substrati e forniscono indicazioni sulle condizioni del sistema suolo (Burns, 1977). Queste metodologie hanno il vantaggio di standardizzare i fattori ambientali (ad esempio pH e temperatura), consentendo il confronto tra suoli di diverse località e con diversa gestione (Schloter et al., 2003).

L'attività idrolasica totale può essere considerata una buona stima dell'attività eterotrofica generale dei microrganismi del suolo in quanto essa è dovuta ad un ampio gruppo di enzimi ad attività lipasica, esterasica e proteasica (Lundgren, 1981; Schnürer and Rosswall, 1982). Questi enzimi esplicano la loro attività rompendo i legami covalenti di macromolecole complesse per aggiunta di una molecola di acqua (Green et al., 2006).

Il substrato utilizzato per la determinazione di questa attività enzimatica è il diacetato di fluoresceina (FDA, 3',6'-diacetylfluorescein): il prodotto finale della reazione enzimatica è la fluoresceina, un composto che può essere visualizzato con un microscopio a fluorescenza o quantificato spettrofotometricamente (Mortensen et al., 1973). Il vantaggio di questo metodo risiede nel fatto che è semplice, rapido e sensibile e può essere utilizzato in diverse tipologie di suolo (Jenkinson e Oades, 1979; Gillian e Duncan, 2001). Oltre che in funghi e batteri (Medzon e Brady, 1969; Lundgren, 1981; Söderström, 1977) la capacità di idrolizzare il diacetato di fluoresceina è stata dimostrata anche in protozoi e alghe (Medzon e Brady, 1969).

E' stato dimostrato che la quantità di fluoresceina prodotta dall'idrolisi dell'FDA è correlata con la biomassa microbica sia in coltura che in suoli sottoposti a diverse tipologie di uso (Vekemans et al. 1989; Perucci 1992) e pertanto, tale attività può essere ritenuta anche una buona stima della biomassa microbica (Sánchez-Monedero, 2008).

Per la determinazione dell'attività idrolasica sono stati pesati 0,25 g di terreno fresco in vials da 35 ml, ai quali sono stati addizionati 6 ml di tampone fosfato 60 mM a pH 7,6 e 100 µl di soluzione di diacetato di fluoresceina (FDA) in acetone, a concentrazione di 2 mg/ml.

I campioni sono stati incubati per un'ora in agitazione, al buio ed alla temperatura di 25°C. Al termine dell'incubazione, per bloccare la reazione, sono stati aggiunti 6 ml di acetone a tutti i campioni. I bianchi sono stati preparati con le stesse modalità, aggiungendo però il substrato soltanto al termine dell'incubazione. Le miscele di reazione sono state centrifugate a 5000 rpm per 5 minuti e successivamente filtrate. Infine è stata determinata l'assorbanza della fluoresceina a 490 nm per via spettrofotometrica, con spettrofotometro UV-visibile a doppio raggio (Lambda EZ201, Perkin Elmer). La quantità di FDA idrolizzato è stata determinata per interpolazione dei valori di assorbanza su una retta di taratura e l'attività enzimatica è stata espressa come µg di FDA idrolizzato per grammo di terreno secco per ora di incubazione.

Attività β-glucosidasi

Le β-glucosidasi sono enzimi coinvolti nella degradazione della cellulosa, in particolare ne completano il processo di idrolisi catalizzando la scissione del cellobiosio con successiva liberazione di due molecole di glucosio. Tale attività enzimatica è particolarmente utile nel monitoraggio della qualità del suolo dato il ruolo centrale che riveste nel ciclo della sostanza organica, a sua volta considerata un indicatore di qualità (Turner et al., 2002).

Questi enzimi sono prodotti da piante, animali, funghi e batteri (Knight e Dick, 2004) e si trovano legati ai colloidi del suolo (Burns, 1982; Nannipieri et al., 1996). L'attività β-glucosidasi è sensibile alla tipologia di gestione del suolo (Dick et al., 1996; Kuperman e Carreiro, 1997; Leirós et al., 1999; Bandick e Dick, 1999; Madejón et al., 2001) e non risente di variazioni stagionali (Bandick and Dick, 1999), pertanto è stata proposta come indicatore della qualità del suolo (Ndiaye et al., 2000).

Per la determinazione dell'attività β-glucosidasi sono stati pesati 0,25 g di terreno fresco in vials da 35 ml e vi sono stati addizionati 1,6 ml di tampone MUB 20 mM a pH 6,0 e 400 µl di soluzione acquosa 0,05 M del substrato para-nitrofenil-β-D-glucopiranoside.

I campioni sono stati incubati per un'ora in agitazione, al buio ed alla temperatura di 37°C. Al termine dell'incubazione sono stati rapidamente raffreddati fino ad una temperatura di 4°C e, per bloccare la reazione, sono stati addizionati 0,4 ml di CaCl₂ 0,5 M, 1 ml di soluzione di NaOH 0,5 M e 5 ml di acqua distillata. I bianchi sono stati preparati con le stesse modalità dei campioni, aggiungendo però il substrato soltanto al termine dell'incubazione. Le miscele di reazione sono state centrifugate a 5000 rpm per 5 minuti e filtrate.

L'assorbanza del paranitrofenolo (PNF) prodotto dalla reazione enzimatica è stata determinata per via spettrofotometrica a 398 nm (Lambda EZ201, Perkin Elmer), mentre la concentrazione è stata ottenuta per interpolazione dei valori di assorbanza su una retta di taratura; l'attività enzimatica è stata espressa come µg di PNF prodotto per grammo di terreno secco in un ora di incubazione.

Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA)

Viste le difficoltà nello studio dei microrganismi del suolo (vedi paragrafo “la comunità microbica del suolo”), spesso ci si avvale di tecniche che consentono di studiare le comunità microbiche nel loro insieme, senza isolare ed identificare le singole specie. Un approccio di questo tipo consiste nello studio del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA). I fosfolipidi sono i principali costituenti delle membrane plasmatiche ed hanno un ruolo unicamente strutturale in quanto non si accumulano nelle cellule come materiale di riserva e, una volta liberati nel suolo dopo la morte della cellula, vengono rapidamente decomposti ad opera degli enzimi idrolitici (pertanto sono associati esclusivamente a cellule microbiche vive). E' stato osservato che cambiamenti della struttura della comunità microbica del suolo si riflettono in cambiamenti del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi, in quanto gruppi microbici differenti presentano una diversa composizione fosfolipidica delle membrane cellulari (Tunlid e White, 1992). Per tale motivo, il profilo dei PLFA è ampiamente utilizzato per studiare a livello di comunità le risposte del microbiota ai cambiamenti delle condizioni ambientali (Bååth *et al.*, 1998).

Inoltre, i fosfolipidi si trovano in proporzioni relativamente costanti nelle cellule e pertanto il contenuto totale di PLFA è considerato un buon indicatore della biomassa microbica (Frostegård e Bååth, 1996), sebbene non esista un fattore di conversione tra concentrazione dei PLFA e biomassa.

L'analisi del profilo dei PLFA è stata effettuata per il solo campionamento primaverile, secondo la metodica di Frostegård *et al.* (1993). La procedura analitica si sviluppa in quattro fasi:

1. estrazione dei lipidi dai campioni di terreno

10 ml di estraente Bligh & Dyer (CHCl₃: MeOH: tampone citrato 1:2:0.8 v/v/v) sono stati aggiunti, per tutti i campioni da analizzare, a 1 g di terreno scongelato pesato in tubi in teflon. Dopo agitazione, i campioni sono stati lasciati a riposo per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato trasferito in provettoni di vetro. Il suolo rimanente nelle provette in teflon è stato lavato con altri 5 ml di estraente e la procedura è stata ripetuta.

Si è proceduto con l'aggiunta di 4 ml di CHCl_3 e 4 ml di tampone citrato a pH 4,0. Dopo agitazione i campioni sono stati lasciati a riposo overnight a temperatura ambiente e, durante quest'arco di tempo, si sono separate due fasi: una contenente i lipidi in CHCl_3 e l'altra contenente sostanze idrosolubili, quali carboidrati e proteine, in metanolo ed acqua. La fase lipidica (quella sottostante) di ogni campione è stata trasferita in provette di vetro ed il solvente è stato fatto evaporare sotto flusso di azoto a 40°C.

2. frazionamento dei lipidi in base alla loro polarità

I lipidi estratti sono stati separati nelle differenti classi tramite LPC (Low Pressure Chromatography) in ordine di polarità crescente. Il materiale essiccato è stato disciolto in 100 µl di cloroformio e, dopo agitazione, è stato introdotto in colonnine preimpaccate con gel di silice. Sono stati eluiti prima i lipidi neutri utilizzando come eluente 1,5 ml di CHCl_3 , poi i glicolipidi con 6 ml di acetone, ed infine i fosfolipidi con 1,5 ml di MeOH. L'eluato contenente i fosfolipidi è stato raccolto in provette pulite e si è provveduto a far evaporare il solvente sotto flusso di azoto a 40°C.

3. transesterificazione (metilazione) degli acidi grassi dei fosfolipidi

Gli acidi grassi dei fosfolipidi sono stati transesterificati e convertiti in metilesteri, analizzati per gascromatografia. Pertanto, ad ogni campione essiccato sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di standard interno 19:0 in esano ed il solvente è stato allontanato sotto flusso di azoto. I campioni così ottenuti sono stati disciolti in 1 ml di soluzione toluene-metanolo (1:1 v/v), cui è stato addizionato 1 ml di soluzione 0,2 M di KOH in metanolo, e sono stati successivamente incubati a 37°C per 15 minuti per favorire il processo di transesterificazione. Una volta raffreddati, sono stati aggiunti 2 ml di soluzione esano:cloroformio (4:1), 0,3 ml di acido acetico glaciale 1 M e 2 ml di acqua ultrapura. In seguito ad agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti e la fase superiore è stata trasferita in provette di vetro calcinate. Infine si è provveduto all'evaporazione del solvente sotto flusso di azoto.

4. analisi dei metilesteri gli acidi grassi per gascromatografia

Il materiale essiccato, costituito dai metilesteri degli acidi grassi, è stato ridisciolti in 50 µl di esano. A questo punto si è proceduto alla lettura dei campioni per via cromatografica, utilizzando un Focus GC dotato di FID (Flame Ionization Detector) e di colonna capillare HP5 (lunghezza = 50 m; diametro interno = 0,25 mm), avente come fase stazionaria metil-fenil-silicone. La temperatura di iniezione è stata impostata ad 80°C, come la temperatura iniziale; quest'ultima è stata mantenuta costante per un minuto e successivamente è stata fatta aumentare ad intervalli di 20°C, fino a raggiungere una temperatura di 160°C, poi di 5°C al minuto fino a 270°C e mantenuta in tali condizioni per 20 minuti. I PLFA determinati sono indicati in tabella (5).

i14:0	gram-positivi	cy17:0	gram-positivi
14:0		17:0	
i15:0	gram-positivi	br18:0	gram-positivi
a15:0	gram-positivi	10Me17:0	gram-positivi
15:0		18:2 ω 6,9	funghi
i16:0	gram-positivi	18:1 ω 9	funghi
16:1 ω 9		18:1 ω 7	gram-negativi
16:1 ω 7c	gram-negativi, funghi	18:1	
16:1 ω 7t	batteri	18:0	
16:1 ω 5	gram-negativi, micorrize VA	19:1a	gram-negativi
16:0		10Me18:0	actinomiceti
br17:0	gram-positivi	19:1b	funghi (?)
10Me16:0	batteri, funghi	19:0	standard
i17:0	gram-positivi	cy19:0	gram-negativi
a17:0	gram-positivi	20:4	funghi, micorrize VA
17:1 ω 8	funghi (?)	20:0	

Tabella 5: PLFA analizzati (in ordine di eluizione) e relativa provenienza dai diversi gruppi microbici (cfr. Wilkinson et al., 2002).

Profilo di risposta catabolica

Lo studio della diversità funzionale delle comunità microbiche può fornire informazioni importanti sulla funzionalità del sistema suolo (Zak et al., 1994; Trevors, 1998). La diversità funzionale è una componente della diversità complessiva del suolo ed è la conseguenza delle interazioni tra variabilità genetica inter e intra specifica, dell'influenza dei fattori ambientali sull'espressione dei geni e delle interazioni ecologiche tra i taxa (Zak et al., 1994). Essa include numerose funzioni della comunità microbica quali la decomposizione, le trasformazioni dei nutrienti la promozione/soppressione della crescita delle piante e l'alterazione dei processi fisici del suolo (Giller et al., 1997). Questa componente della diversità è differente da quella ottenuta misurando la diversità di specie in quanto fornisce informazioni sulla varietà e sull'uniformità (evenness) delle funzioni espresse in situ dalla comunità microbica, piuttosto che sul numero (richness) ed il tipo (composition) di specie presenti nel suolo (Degens et al., 2001). Non va trascurato che nel suolo i microrganismi presenti non necessariamente sono attivi, ma possono trovarsi in una forma dormiente (van Veen e Heijnen, 1994; Meikle et al., 1995; Trevors, 1998).

La diversità funzionale è inferiore alla diversità tassonomica. Infatti, le comunità microbiche del suolo sono caratterizzate da un elevato grado di ridondanza funzionale, in quanto una stessa funzione può essere svolta da molte specie (Walker, 1992). Ciò fa sì che, in caso di scomparsa di

una specie, altre specie possono espandere la loro nicchia e compensare la funzione della specie venuta a mancare (Andrén et al., 1995). In ogni caso, avere ridondanza per una singola funzione non vuol dire che lo siano tutte (Giller et al., 1997). Se le condizioni ambientali sono costanti può essere sufficiente un numero di specie minimo per mantenere determinate funzioni, ma in un ecosistema disturbato maggiori saranno la diversità intra e interspecifica o la diversità funzionale, maggiori saranno la tolleranza alle perturbazioni e la resilienza del sistema (Elliott e Lynch, 1994; Pankhurst et al., 1996; Giller et al., 1997; Loreau, 2001; Nannipieri et al., 2003).

Un metodo semplice che permette di valutare la diversità funzionale del suolo come capacità di degradare una varietà di substrati, è rappresentato dal profilo di risposta catabolica (CRP), proposto da Degens e collaboratori (Degens e Harris, 1997; Degens et al., 2000). Questo metodo consiste nel somministrare direttamente ai campioni di suolo una serie di substrati organici semplici (zuccheri, aminoacidi, acidi carbossilici), che, nella misura in cui vengono utilizzati dal microbiota come fonte di carbonio ed energia, inducono una risposta catabolica, misurabile come incremento di respirazione (aumento dell'evoluzione di CO₂) nel breve termine. Il breve periodo di incubazione (4 ore) fa sì che il pattern (o profilo) delle risposte cataboliche sia relativo alla sola componente attiva della comunità e non a quella dormiente (Degens et al., 2000). Il legame tra diversità catabolica e funzionamento del suolo non è chiaro e una riduzione della diversità catabolica non necessariamente comporta il declino di una funzione, come osservato da Degens (1998) in uno studio sulla decomposizione (Degens, 1998), tuttavia una riduzione della diversità catabolica aumenta la vulnerabilità del sistema suolo allo stress e al disturbo (Degens et al., 2001).

Per lo studio del profilo di risposta catabolica dei suoli si è utilizzata la metodica proposta da Degens e collaboratori (2000). I campioni di suolo sono stati previamente idratati fino al raggiungimento del 55% della CIM, in modo tale che la comunità microbica avesse a disposizione la quantità d'acqua ottimale. Per ogni campione sono state preparate, all'interno di vials da 35 ml, 25 aliquote di terreno fresco idratato, corrispondenti ad 1 g di peso secco; ogni aliquota è stata ammendata con 2 ml di una delle 25 soluzioni acquose dei diversi substrati (indicati in tabella 6), previamente portate a pH compreso tra 5,8 e 6. Per ciascun terreno è stato preparato anche un bianco non ammendato, contenente soltanto il terreno e 2 ml di acqua distillata, che ha permesso di determinare la respirazione basale (Degens et al., 2001). Le vials sono state sigillate ermeticamente con tappi in butile e ghiera in alluminio e incubate a 25°C al buio per 4 ore. Al termine dell'incubazione, la concentrazione di CO₂ nello spazio di testa è stata misurata con un gascromatografo (Agilent Technologies 6850, Network GC System, dotato di TCD (Thermal Conductivity Detector) e di colonna capillare HP-PLOT Q (lunghezza = 30 m; diametro interno =

0,32 mm). Come carrier è stato utilizzato elio a 2,5 ml/min; la temperatura del forno è stata costantemente mantenuta a 50°C; la temperatura del detector è stata impostata a 250°C, mentre la temperatura di iniezione a 200°C. Per evitare l'interferenza da parte del vapore acqueo eventualmente presente, il campione di aria è stato preriscaldato nella valvola di iniezione a 150°C. La risposta respiratoria per ciascun substrato è stata calcolata come incremento della CO₂ rispetto al controllo non ammendato (respirazione basale).

La risposta catabolica è stata espressa come CE (catabolic evenness), un indice di uniformità della risposta respiratoria ai substrati (se la risposta è uniforme, il massimo valore che si può ottenere con 25 substrati è 25). La CE è stata calcolata applicando l'equazione di Simpson-Yule:

$$CE = 1/\sum p_i^2$$

Dove p_i è la risposta respiratoria indotta dall' i -esimo substrato espressa come frazione della risposta respiratoria totale indotta da tutti i substrati.

Acidi carbossilici	Zuccheri	Aminoacidi
acido L-ascorbico	D-glucosammina	L-arginina
acido citrico	D-glucosio	L-asparagina
acido fumarico	D-mannosio	L-glutammina
acido gluconico		L-istidina
acido α -chetobutirrico		L-lisina
acido α -chetoglutarico		L-serina
acido α -chetovalerico		acido L-glutammico
acido DL-malico		
acido malonico		
acido pantotenico		
acido quinico		
acido succinico		
acido tartarico		
acido urico		
acido urocanico		

Tabella 6: substrati utilizzati per determinare il profilo di risposta catabolica dei suoli studiati.

➤ **Analisi statistica dei dati**

La significatività delle differenze tra le concentrazioni di metalli e IPA nelle foglie e nei suoli studiati è stata testata mediante ANOVA a due vie per le foglie, utilizzando le regioni e i siti di campionamento come variabili fisse, e mediante ANOVA a tre vie per il suolo, utilizzando le regioni, i siti di campionamento e il tempo come variabili fisse. Le analisi sono state effettuate su dati normalizzati mediante trasformazione logaritmica. Il test post-hoc di Holm-Sidak ($\alpha = 0,05$) è stato successivamente utilizzato per confronti multipli.

Per verificare una possibile origine comune dei contaminanti determinati nelle foglie e nel suolo, così come le relazioni tra la frazione disponibile degli elementi e la concentrazione totale, sono state saggiate le correlazioni, utilizzando il test di Pearson o quello di Spearman, rispettivamente per dati con distribuzione normale o meno.

Per l'ANOVA e per le correlazioni è stato utilizzato il software Sigma Plot 11 (Systat Software, Inc.).

Per avere una visione di insieme, i dati sono poi stati analizzati mediante analisi delle componenti principali (PCA), utilizzando il software MVSP versione 3.2.

RISULTATI E DISCUSSIONE

➤ Gradienti di contaminazione definiti mediante analisi delle foglie di leccio

Concentrazione di elementi

L'analisi elementale di foglie di leccio è particolarmente utile per definire gradienti di concentrazione di elementi in traccia in atmosfera, anche se sono presenti in piccole quantità o temporaneamente (Alfani et al., 2000).

Gli elementi analizzati hanno generalmente presentato differenze di concentrazione tra le regioni e tra i siti a diverso grado di impatto antropico (figure 12, 13, 14). In particolare, differenze tra le regioni sono state evidenziate per Na, Ca, Fe, Cd, Ni ($P < 0,001$) e per C, Mg, Zn e Cu ($P = 0,01$). Le foglie dei siti campani presentano mediamente concentrazioni più alte di Na, Fe, Mg e Zn, quelle dei siti toscani concentrazioni più alte di Ca, Ni e Cu. Relativamente al Cd (figura 14), sebbene mediamente le foglie presentino concentrazioni confrontabili (circa $0,02 \mu\text{g/g p.s.}$) nei siti delle due regioni, sono le foglie del transetto toscano (figura 14) a presentare in assoluto il più alto valore ($0,03 \mu\text{g/g p.s.}$).

Nei siti oggetto di studio, le concentrazioni di C nelle foglie (figura 12) sono risultate mediamente confrontabili ($50,43$ e $51,48 \%$ p.s., rispettivamente per Campania e Toscana). Tali risultati, inoltre, sono simili a quelli riportati in letteratura per foglie di leccio (Alfani et al., 2000).

Le concentrazioni fogliari di N, K e Ca sono confrontabili nei transetti urbani di ciascuna regione (figure 12, 13) e, fatta eccezione per il Ca in Campania, i siti remoti delle due regioni (C5 e T5) presentano valori significativamente ($P = 0,05$) più bassi rispetto agli altri siti. Le concentrazioni di N, pari $15,08$ e $13,80 \text{ mg/g p.s.}$, rispettivamente per le foglie di Ottati e Cala Violina, sono confrontabili con quelle riportate in letteratura per la stessa specie (Alfani et al., 2000).

Ai fini di una più precisa valutazione degli accumuli nelle foglie, la concentrazione degli elementi misurata in ciascuna area di studio è stata confrontata col valore del fingerprint chimico del leccio (Bargagli et al., 1998) che indica le naturali concentrazioni degli elementi in questa matrice, in assenza di fattori di inquinamento e di bioaccumulo. Per N, K e Ca vi è un superamento notevole sia del valore del fingerprint chimico, sia delle concentrazioni riportate da diversi autori (Manes et al., 1997; Monaci et al., 2000; De Nicola et al., 2003). In particolare, le elevate concentrazioni di N fanno pensare a fenomeni di deposizione atmosferica (Lindberg et al., 1987) e di assorbimento di ossidi di azoto attraverso gli stomi (Gebauer et al., 1994; Stulen et al., 1998). In ogni caso, l'assenza di un preciso gradiente da siti urbani a siti remoti, suggerisce una diffusione dell'azoto in atmosfera

legata anche alle diverse caratteristiche topologiche urbane e alle differenti condizioni meteorologiche (Danish e Madany, 1992).

Zn, Mg e Mn (figura 13), sia in Campania che in Toscana, mostrano nelle foglie dei transetti urbani un trend di accumulo crescente man mano che ci si allontana dalla strada, sebbene tali differenze non siano risultate significative. Nonostante Zn e Mn siano elementi legati al traffico veicolare (Monaci et al., 2000), le più alte concentrazioni non sono state misurate nei punti del transetto più prossimi alla strada, probabilmente per le caratteristiche locali delle aree studiate (in particolare per la presenza di alti muri di cinta dei parchi) che potrebbero influenzare fortemente le dinamiche di dispersione e di accumulo di questi elementi. Le foglie del sito periurbano campano (C4) presentano concentrazioni di Zn e Mn più alte rispetto al sito remoto (C5), mentre in Toscana il trend è inverso. Tali differenze sono risultate significative ($P = 0,05$) solo per il Mn. Quest'ultimo a Cala Violina mostra un superamento del fingerprint chimico di 14 volte. Le elevate concentrazioni di Mn e le concomitanti elevate concentrazioni di Cr e Ni (figura 14) sono attribuibili alla presenza di un'industria per la produzione di acciai al Si-Mn, che si trova a Piombino (LI), a circa 20 km in linea d'aria (Loppi e Pirintsos 2003) .

Differenze ($P = 0,05$) tra foglie di aree periurbane e remote sono state riscontrate per il Na (figura 13) che ha anche mostrato trend di accumulo diversi nei transetti urbani delle due regioni, con differenze non significative. Si osserva per il Na un superamento del fingerprint di almeno 3 volte nel parco urbano di Capodimonte, agli Astroni e a Cala Violina. Ciò può essere attribuito ad aerosol marino, data la prossimità del mare, come suggerito da De Nicola e collaboratori (2003).

Fe, Cu, Cr, Ni e Pb (figura 14), in ciascuna regione, presentano concentrazioni più alte nelle foglie dei punti del transetto urbano più vicini alla strada (C1 e T1).

Le differenze osservate per questi elementi tra siti periurbani e remoti, in entrambe le regioni, non risultano significative, fatta eccezione per Fe in Campania ($P = 0,05$), dove sorprendentemente Ottati presenta in assoluto il valore più alto (364 $\mu\text{g/g}$ p.s.); questo può essere attribuito ad un trasporto a lunga distanza (Pereira et al., 2004), ma anche alla presenza, in prossimità dell'area di campionamento, di una rete metallica di contenimento. La concentrazione di Fe misurata nelle foglie di Ottati è inoltre di circa 3 volte più alta rispetto ai valori di letteratura (Alfani et al., 2000). I risultati ottenuti per Pb, Cu e Fe risultano comunque coerenti con l'origine antropica di questi elementi, attribuita principalmente al traffico veicolare (Monaci et al., 2000). Tra gli elementi in traccia analizzati, il Pb è quello che presenta le maggiori differenze di concentrazione tra foglie di siti urbani e remoti, mostrando gli accumuli maggiori ($P = 0,05$) nei siti più esposti alla strada. Tale risultato è in accordo con quelli riportati da altri autori (Gratani et al., 2000; Monaci et al., 2000; De Nicola et al., 2008) che per questo elemento ritrovano le maggiori differenze tra aree urbane e

remote. In ogni caso, il valore del fingerprint è superato di poco, coerentemente col fatto che a partire dalla fine degli anni '80, quando l'Italia ha aderito alle direttive europee, l'utilizzo di benzine contenenti Pb è stato drasticamente ridotto (Direttiva 98/70/CEE) o vietato (EU, 1998).

Un andamento meno chiaro tra le aree di studio si osserva per il Cd. Le foglie dei transetti urbani presentano mediamente concentrazioni di questo elemento più alte ($P = 0,05$) rispetto alle foglie dei siti periurbani e remoti che mostrano concentrazioni, tra loro, confrontabili. In Toscana la concentrazione di Cd misurata nel parco urbano è risultata doppia rispetto alle altre aree della regione. Numerosi lavori indicano il traffico veicolare come principale fonte di questo elemento (Kowalczyk et al., 1982; de Miguel et al., 1997; Tremper et al., 2004) e ciò potrebbe spiegare i più alti valori misurati nei transetti urbani. Non sempre però questa origine è confermata (Monaci et al., 2000).

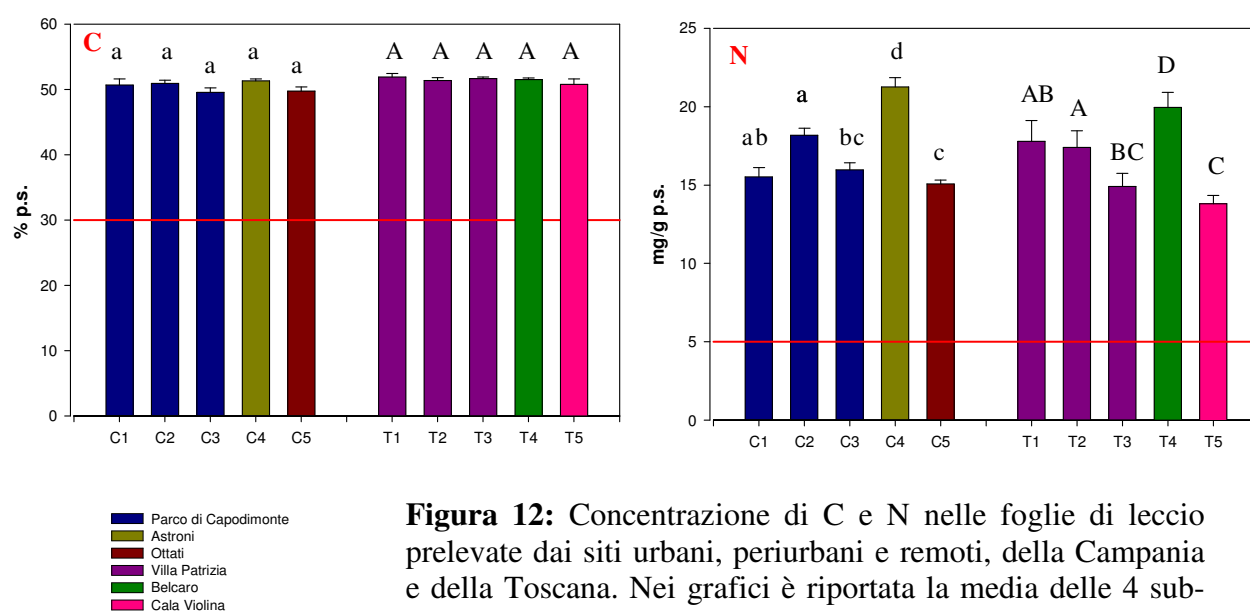


Figura 12: Concentrazione di C e N nelle foglie di leccio prelevate dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore del fingerprint chimico del leccio (Bargagli et al., 1998). Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

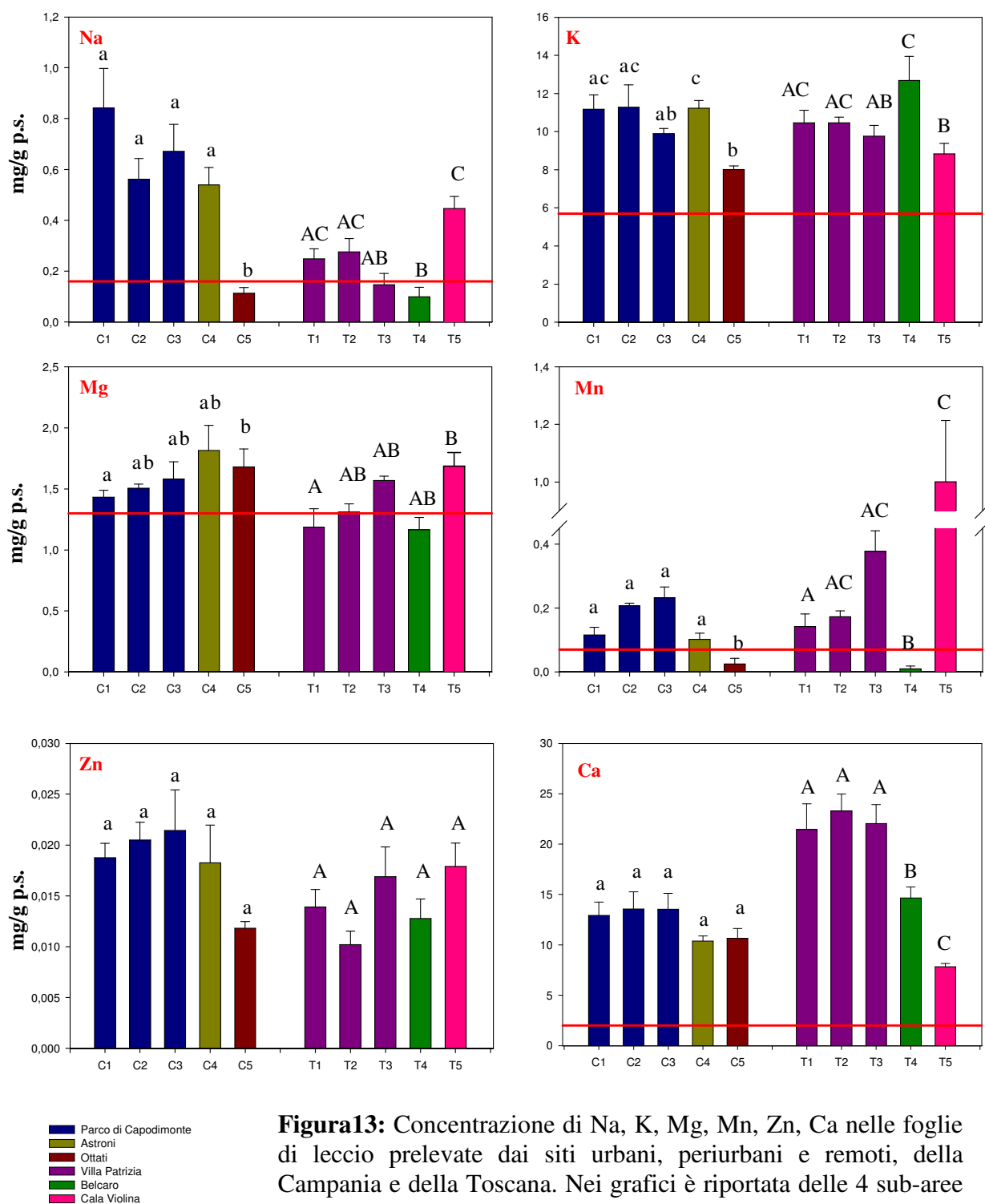


Figura13: Concentrazione di Na, K, Mg, Mn, Zn, Ca nelle foglie di leccio prelevate dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore del fingerprint chimico del leccio (Bargagli et al., 1998). Tale valore per lo Zn è pari a 0,3 mg/g p.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

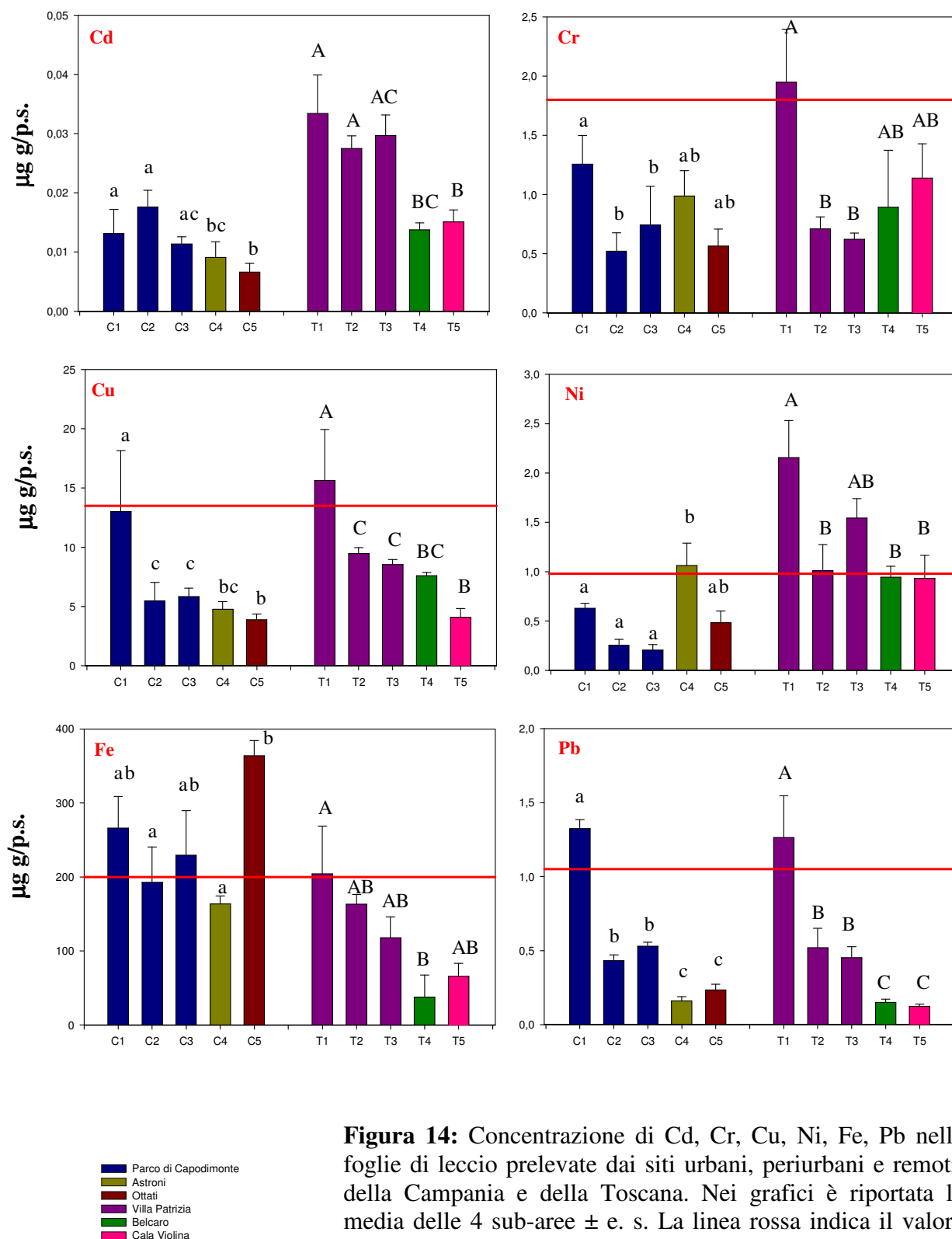


Figura 14: Concentrazione di Cd, Cr, Cu, Ni, Fe, Pb nelle foglie di leccio prelevate dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e. s. La linea rossa indica il valore del fingerprint chimico del leccio (Bargagli et al., 1998). Tale valore per il Cd è pari a 0,3 $\mu\text{g/g}$ p.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

Concentrazione di IPA

Le concentrazioni di IPA misurate nelle foglie di leccio hanno evidenziato differenze tra le regioni oggetto di studio (figura 15a) mostrando valori significativamente ($P < 0,001$) più alti per i siti campani rispetto a quelli toscani (440 e 282 ng/g p.s., in media rispettivamente). Le differenti concentrazioni misurate nelle foglie di aree diverse riflettono i gradienti di contaminazione atmosferica, sebbene non sia possibile definire una relazione quantitativa tra concentrazione di IPA in atmosfera e nelle foglie (De Nicola et al., 2011 b).

In ciascuna regione, sono le foglie dei punti del transetto più vicini alla strada (C1 e T1) a presentare la più alta concentrazione di IPA ($P = 0,05$), a conferma dell'importanza del traffico veicolare come principale fonte di questi composti in ambiente urbano (Schauer et al., 2003). Le concentrazioni misurate nelle foglie lungo i tre punti del transetto del parco urbano campano risultano più basse di quelle riportate in precedenti lavori per diversi siti dell'area urbana di Napoli (De Nicola et al., 2005; 2008) ma confrontabili con quelle misurate da Alfani e collaboratori nello stesso parco (2001). Le concentrazioni di IPA misurate nelle foglie del sito di Ottati risultano confrontabili con quelle misurate nelle foglie dei punti più interni del transetto (C2, C3) e del sito periurbano (C4). Per cercare di comprendere meglio questo risultato sono stati calcolati alcuni rapporti tra idrocarburi (fluorantene/pirene, fenantrene/antracene, crisene/benzo(a)antracene, fluorantene/fluorantene+pirene, antracene/antracene+fenantrene, benzo(a)antracene/benzo(a)antracene+crisene, indeno(1,2,3-cd)pirene/indeno(1,2,3-cd)pirene+benzo(g,h,i)perilene). Questi rapporti sono stati usati da diversi autori per identificare le possibili fonti di emissione, discriminando tra fonti pirogeniche e petrogeniche (Soclo et al., 2000; Yunker et al., 2002; De Nicola et al., 2011b). Relativamente ai risultati di questo studio, tali rapporti tra IPA non sono riusciti a fornire una chiara discriminazione delle fonti tra le aree di studio, sebbene indichino per alcuni siti urbani un contributo del traffico veicolare. I rapporti tra IPA isomeri mostrano spesso variabilità anche se applicati alla stessa sorgente e similarità tra sorgenti diverse, rendendo quindi non sempre facile l'identificazione delle fonti, soprattutto se raggruppate per grosse categorie (Galarneau, 2008). Questi rapporti sono indubbiamente influenzati dalle fonti di emissione, ma i pattern di distribuzione degli idrocarburi possono variare anche in funzione della modalità di trasporto dei singoli IPA (in fase gassosa e in fase particolata) e dei fenomeni di degradazione che i singoli IPA subiscono (Lehndorff e Schwark, 2004).

Per valutare il potenziale cancerogeno associato all'esposizione, sono state calcolate le concentrazioni di benzo(a)pirene equivalente, $B[a]P_{eq}$. A ciascun IPA cancerogeno è stato associato un fattore di tossicità equivalente (TEF) secondo quanto riportato da Tsai et al. (2004).

Moltiplicando questo valore associato a ciascun IPA cancerogeno per la concentrazione dello stesso, si ottiene la concentrazione di B[a]P_{eq}.

Si osserva che il più alto potenziale cancerogeno è associato al sito remoto campano (figura 15b); dove il benzo(a)pirene è l'idrocarburo mediamente più rappresentato (137 ng/g p.s.). Le differenze osservate tra regioni e tra siti della stessa regione, relativamente al potenziale cancerogeno, non sono risultate significative. Il confronto delle concentrazioni totali di IPA con le concentrazioni di B[a]P_{eq} evidenziano che non sempre i valori maggiori di IPA totali misurati in un sito riflettono il maggiore potenziale cancerogeno dello stesso (figura 15a,b).

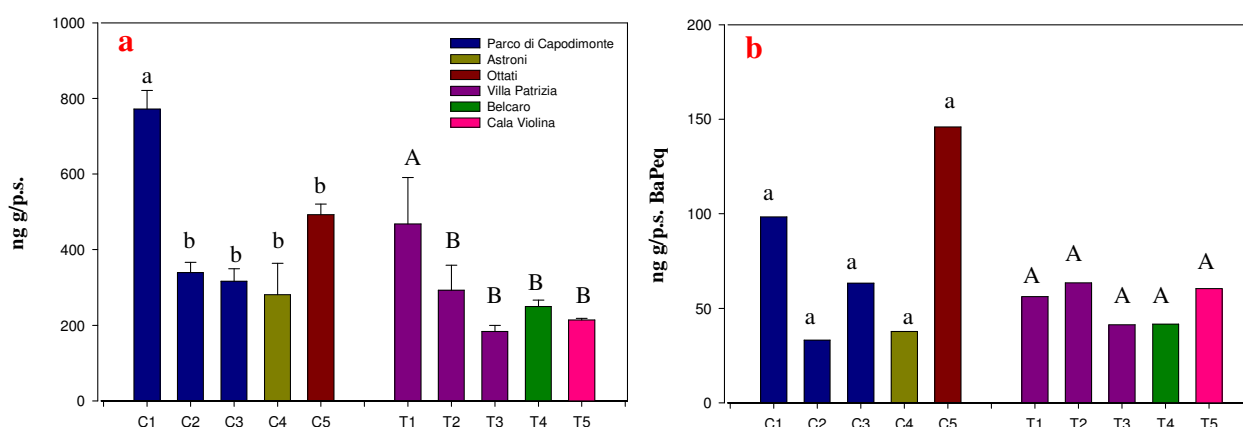


Figura 15: Concentrazione di IPA totali (a) e di B[a]P_{eq} (b) in foglie di leccio della Campania e della Toscana. Per ciascun sito di campionamento è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

Gli IPA determinati nelle foglie sono stati suddivisi in base al peso molecolare (LMW, MMW e HMW rispettivamente a basso, medio e alto peso molecolare) (figura 16) secondo quanto riportato da Harner e Bidleman (1998).

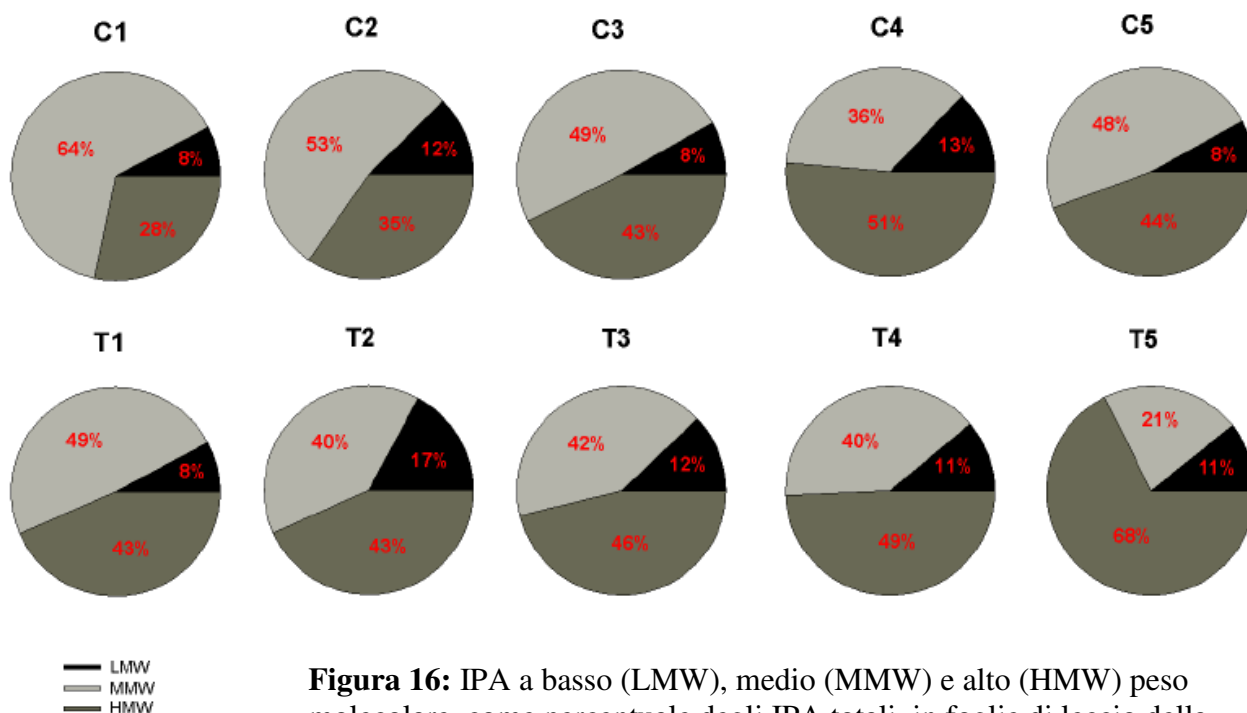


Figura 16: IPA a basso (LMW), medio (MMW) e alto (HMW) peso molecolare, come percentuale degli IPA totali, in foglie di leccio della Campania e della Toscana.

Nelle foglie di leccio, sia in Campania che in Toscana i LMW sono gli IPA meno rappresentati sul totale (mediamente 8% e 12%, rispettivamente per Campania e Toscana), mentre i MMW sono mediamente i più abbondanti in Campania (circa 50% del totale) e gli HMW sono i più rappresentati in Toscana (50% del totale). Generalmente gli IPA ad alto peso molecolare tendono a depositarsi vicino alle fonti di emissione (Alfani et al., 2001), pertanto risulta anomalo il valore del 68% misurato per gli IPA HMW nelle foglie del sito di Cala Violina (T5), lontano da fonti dirette di emissione.

La matrice di correlazione tra elementi e IPA nelle foglie (figura 17) mostra che Ca, Cd, Cu, Fe, e IPA totali sono correlati positivamente al Pb. Quest'ultimo, sebbene le sue concentrazioni in atmosfera si siano ridotte con l'abolizione dell'uso di benzine addizionate con Pb, è tutt'ora un marker del traffico autoveicolare (Monaci et al., 2000) da cui dipendono, evidentemente, anche le emissioni degli altri elementi ad esso correlati e degli IPA. Alcuni autori (Cardle et al., 1997) riportano, ad esempio, che il Ca viene usato negli additivi per gli oli per motori, pertanto è verosimile ipotizzare un'origine comune per questi contaminanti, attribuibile principalmente al traffico veicolare, come già evidenziato in precedenti studi di biomonitoraggio (Alfani et al., 2001).

C	1																
N	n.s.	1															
Na	n.s.		1														
K	n.s.	0,631	n.s.	1													
Mg	-0,424	n.s.	n.s.	n.s.	1												
Ca	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,336	1											
Fe	-0,368	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1										
Mn	n.s.	-0,365	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1									
Zn	n.s.	n.s.	0,500	n.s.	0,388	n.s.	n.s.	0,401	1								
Cu	0,398	n.s.	n.s.	n.s.	-0,467	0,657	n.s.	n.s.	n.s.	1							
Ni	0,423	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,393	n.s.	n.s.	n.s.	0,399	1						
Cd	0,509	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,626	n.s.	0,333	n.s.	0,584	0,455	1					
Pb	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,339	0,536	0,429	n.s.	n.s.	0,611	n.s.	0,378	1				
Cr	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1			
IPA tot	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,583	-0,398	n.s.	n.s.	-0,330	n.s.	0,410	n.s.	1		
	C	N	Na	K	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Cd	Pb	Cr	IPA tot		

P≤0,05

P≤0,01

P≤0,001

P≤0,0001

Figura 17: Matrice di correlazione tra le concentrazioni di elementi e IPA totali in foglie di leccio della Campania e della Toscana.

Analisi multivariata

L'analisi delle foglie di leccio ha fornito importanti indicazioni relative alla contaminazione da IPA e metalli nelle aree investigate.

Per avere una visione di insieme, i dati relativi alle concentrazioni di elementi e IPA totali sono stati analizzati mediante analisi delle componenti principali (PCA) (figura 18). La prima componente principale evidenzia (figura 18a) per ciascuna regione una separazione tra i punti del transetto più vicini alla strada (C1 e T1) e tutti gli altri confermando l'importante influenza del traffico veicolare sulle caratteristiche chimiche delle foglie esposte a questo tipo di inquinamento. Nella seconda componente principale si osserva la separazione tra le due regioni. È interessante l'informazione che viene fornita dai loadings (figura 18b), in quanto si vede che i parametri legati alla contaminazione sono quelli principalmente responsabili della separazione dei siti del transetto più vicini alla strada.

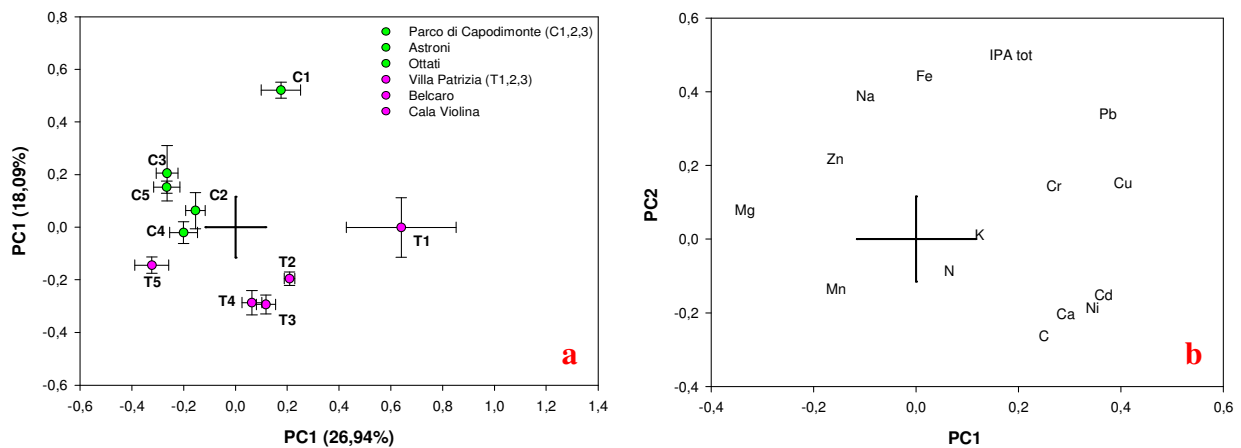


Figura 18: PCA applicata alle concentrazioni di elementi (C, N, Fe, K, Na, Mg, Mn, Zn, Ca, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb) e IPA totali nelle foglie di leccio prelevate dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. In a) sono riportati gli scores come valore medio \pm e. s., in b) la distribuzione dei loadings.

➤ Descrizione delle carote di suolo

Si riporta di seguito una breve descrizione delle osservazioni effettuate sulle carote di suolo campionate nei siti urbani e periurbani di ciascuna regione.

C1 (figura 19):

Il suolo del sito del transetto campano più vicino alla strada era caratterizzato da uno strato superficiale di lettiera abbondante (circa 2 cm) dove erano però presenti poche ife. Anche nell'orizzonte organico sottostante (5YR 2,5/1 black), di circa 4 cm, le ife erano sporadiche. Subito al di sotto vi era uno strato minerale di circa 4 cm che può essere definito come 2,5YR 2,5/1 black.

Gli orizzonti individuati presentavano margini di passaggio regolari e, sia per lo strato organico che per quello minerale, è stata evidenziata una forte effervescenza in seguito ad aggiunta di HCl.

Entrambi gli strati mostravano presenza di pomici e ciottoli.



Figura 19: Carota di suolo prelevata nel sito C1.

C2 (figura 20):

La lettiera del sito intermedio del transetto campano era costituita da foglie, ghiande e ramoscelli. Al di sotto vi era un orizzonte superiore grigiastro (2,5 Y 3/2 very dark grayish brown) caratterizzato dalla presenza di ciottoli dal diametro di circa 3 mm. Questo strato con uno spessore variabile da pochi mm a 1,5 cm, sovrastava l'orizzonte organico (5YR 2,5/1 black). Il passaggio tra i due orizzonti era sinuoso ma ben evidenziabile. Nello strato organico, che appariva eterogeneo, è stata osservata la presenza di lettiera decomposta e di abbondanti feci di artropodi, e presenza sporadica di radici e ife (figura 21).

Per entrambi gli orizzonti non è stata osservata effervescenza dopo aggiunta di HCl.



Figura 20: Carota di suolo prelevata nel sito C2.

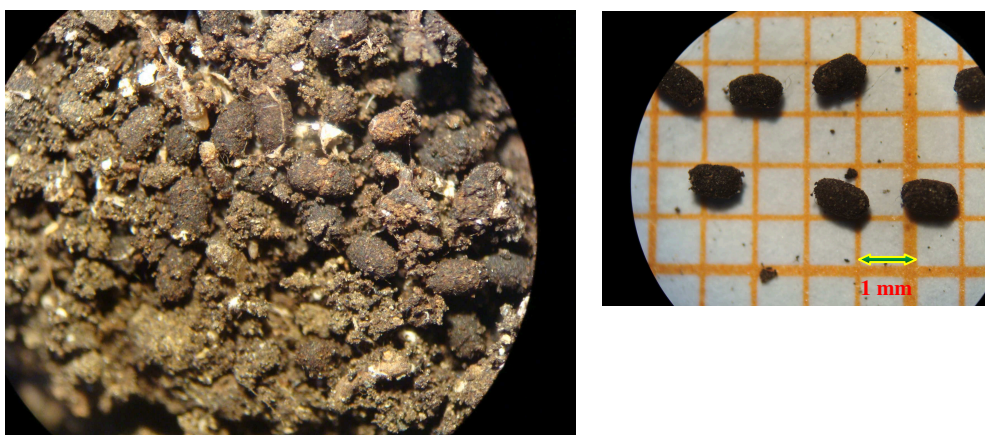


Figura 21: Feci di artropodi

C3 (figura 22):

La carota del sito più interno del transetto campano si presentava con passaggi netti e con margini non regolari tra gli orizzonti; la carota di terreno prelevata poggiava su un alto basamento di tufo (materiale di risulta). La lettiera si trovava all'incirca nei primi 2 cm del profilo ed era costituita da foglie, rametti e ghiande. Le ife erano scarse lungo tutto il profilo.

Dai 2 ai 4 cm era evidenziabile l'orizzonte organico (7,5YR 2,5/1 black) e, al di sotto quello minerale (7,5YR 3/1 very dark gray).

Per entrambi gli orizzonti non è stata osservata effervescenza in presenza di HCl.

Anche in questa carota sono state trovate feci di artropodi, ma meno abbondanti di quelle osservate nella carota prelevata nel sito C2.



Figura 22: Carota di suolo prelevata nel sito C3.

C4 (figura 23):

Lo strato di lettiera della carota del sito periurbano campano era abbondante (circa 5 cm) e costituito da foglie di leccio, rametti e ghiande. Lo strato inferiore della lettiera era costituito da materiale molto frammentato e misto allo strato organico: la separazione tra lettiera e strato organico non era netta. L'orizzonte organico (2,5 YR 2,5/1 reddish black) occupava uno strato di spessore non uniforme da 0,5 a 2,0 cm, con lingue anche fino a 4,0 cm. Al di sotto vi era uno strato grigiastro minerale (2,5 Y 4/2 dark grayish brown). La linea di separazione con l'orizzonte minerale sottostante si mostrava irregolare (sinuosa e ondulare).

Nella lettiera e lungo il profilo le ife erano sporadiche. Nel complesso il profilo si presentava molto sciolto.



Figura 23: Carota di suolo prelevata nel sito C4 .

T1 (figura 24):

Il suolo del punto del transetto più prossimo alla strada si presentava ricoperto da uno strato di lettiera di circa 3 cm costituita da ghiande, stecchi e foglie. Nella lettiera sono state ritrovate feci di artropodi. L'orizzonte organico è risultato supportato da radici di edera. Sotto i 9 cm del profilo è presente un orizzonte emi-minerale (10YR 3/2 (dry)) che presenta ciottoli fino a 3,5 cm di diametro. Gli orizzonti individuati presentavano effervescenza in seguito ad aggiunta di HCl. Tutto il profilo poggia su pezzi di mattoni e altro materiale edilizio in grossi frammenti.



Figura 24: Carota di suolo prelevata nel sito T1.

T2 (figura 25):

La lettiera della carota del punto intermedio del transetto toscano si presentava abbondante e poco decomposta, in alcuni punti tenuta insieme da ife. Il suolo si presentava nel complesso fine e argilloso. Lo strato organico presentava abbondanza di feci di artropodi ed effervescenza per aggiunta di HCl. L'orizzonte emi-minerale 10YR 4/4 (dry), al di sotto dei 9 cm era in prevalenza sabbioso e presentava ciottoli.



Figura 25: Carota di suolo prelevata nel sito T2.

T3 (figura 26):

La lettiera del punto più interno del transetto toscano, costituita da foglie, ghiande e stecchi era poco abbondante e poco decomposta. Nella lettiera i frammenti erano tenuti insieme da ife. Al di sotto e fino a circa 5 cm, vi era uno strato organico nero nel quale sono state individuate feci di artropodi. Il passaggio all'orizzonte successivo si articolava in lingue sinuose con precipitazioni locali di carbonati. Al di sotto vi era un orizzonte emi-minerale 10YR 4/3 (dry) molto compatto. Il profilo nell'insieme si presentava compatto, con venature o chiazze aranciate.



Figura 26: Carota prelevata nel sito T3.

T4 (figura 27):

La lettiera del sito periurbano toscano si presentava poco abbondante e poco decomposta e occupava mediamente i primi due centimetri del profilo. Fino ai 5-8 cm di profondità vi era un orizzonte organico più scuro nel quale sono state individuate feci di artropodi. Il passaggio verso l'orizzonte emi-minerale era sinuoso e a circa 7 cm, di profondità vi erano accumuli di carbonati. L'orizzonte emi-minerale, localizzato al di sotto dei 7 cm, si presentava sabbioso bruno-giallastro 10YR 4/3 (dry), molto compatto e con grossi ciottoli.



Figura 27: Carota prelevata nel sito T4.

➤ Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli studiati

✚ Sostanza organica, CIM, pH

Per i parametri chimico-fisici misurati, le differenze osservate tra regioni non sono risultate significative. Complessivamente i siti studiati presentano un contenuto medio di sostanza organica pari al 26,4%.

Sia in Campania che in Toscana, i punti dei transetti (C1, C2, C3 e T1, T2, T3) mostrano andamenti confrontabili tra loro e le differenze osservate, in ciascuna regione, non sono risultate significative (figura 28a,b). In Campania il sito remoto (C5) presenta in assoluto il contenuto di sostanza organica più alto (41%, mediamente per i due campionamenti), quello toscano (T5) il più basso, con valori pari a $\frac{1}{3}$ rispetto agli altri siti della stessa regione (9%, mediamente per i due campionamenti); tali differenze sono risultate significative ($\alpha = 0,05$). Il basso contenuto di sostanza organica in T5 è verosimilmente attribuibile alle caratteristiche tessiturali del suolo, essendo questo un suolo sabbioso.

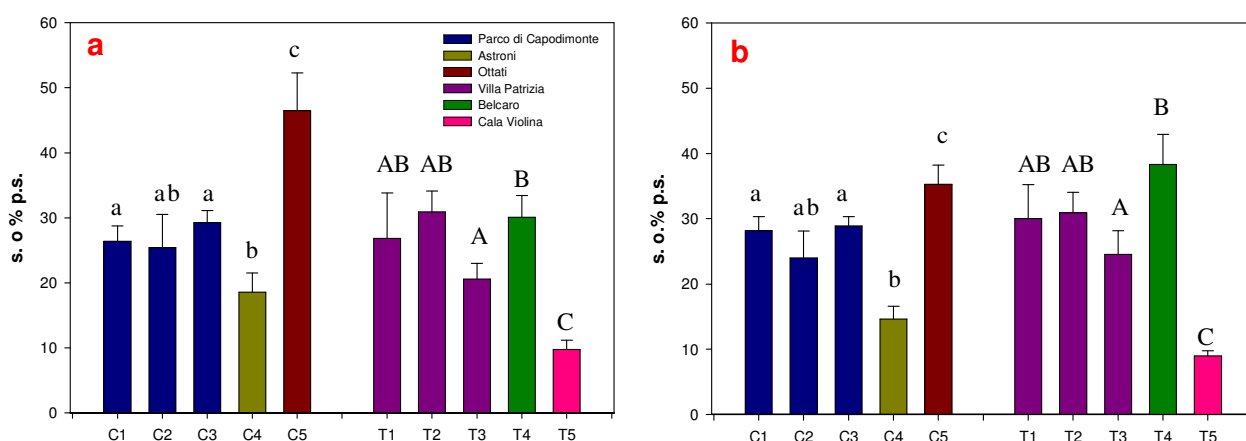


Figura 28: Contenuto di sostanza organica per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e. s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

Poiché la CIM è una proprietà del suolo che non varia nel breve tempo, è stata determinata per il solo campionamento primaverile (figura 29). Per quanto concerne le differenze tra siti, nell'ambito di ciascuna regione, la CIM risulta confrontabile tra i punti del transetto (C1, C2, C3 e T1, T2, T3) e il sito periurbano (C4 e T4), con valori medi del 98% e 130% p.s., rispettivamente, per la Campania e la Toscana. Differenze significative ($\alpha = 0,05$) si osservano tra i siti remoti (C5 e T5) e le altre

aree di studio della regione, con Ottati che presenta in assoluto la CIM più alta (161% p.s.) e Cala Violina quella più bassa (69% p.s.).

Gli andamenti osservati per questo parametro riflettono il contenuto di sostanza organica, coerentemente col fatto che quest'ultima, essendo in grado di trattenere notevoli quantità di acqua, pari anche a diverse volte il suo peso, influenza fortemente la capacità di ritenzione idrica del suolo.

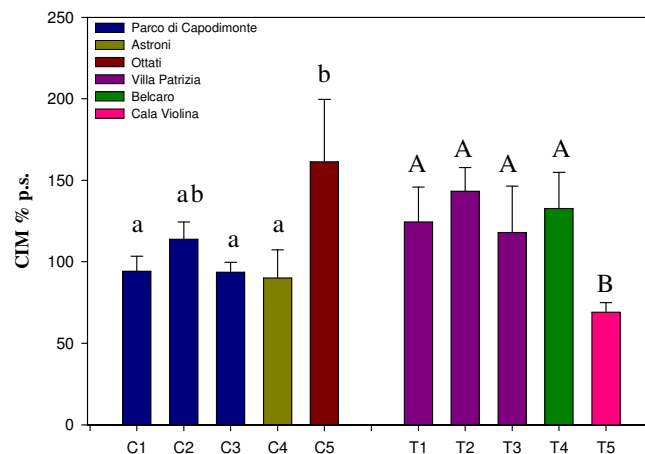


Figura 29: Capacità idrica massimale dei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 subaree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

I suoli di tutte le aree di studio, ad eccezione di Cala Violina, presentano valori di pH (figura 30) compresi tra 6,0 e 7,2 e possono pertanto essere classificati come subacidi-neutri (Bullini et al., 1998). Il suolo del sito remoto toscano (con valori 5,3 e 5,8) può essere invece classificato come acido (Bullini et al., 1998). Le differenze osservate tra siti risultano significative ($\alpha = 0,05$).

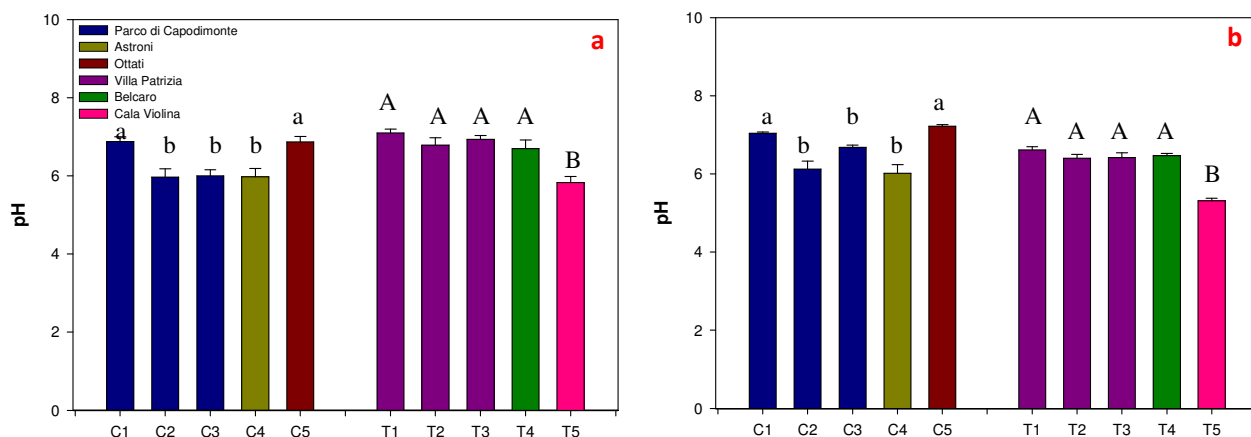


Figura 30: valori di pH per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e. s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

🚧 Concentrazione totale e frazione disponibile di nutrienti ed elementi in traccia

Per una più precisa valutazione delle concentrazioni di nutrienti ed elementi in traccia nei suoli, la concentrazione totale di ciascun elemento, misurata in ciascuna area di studio, è stata confrontata con l'intervallo di concentrazione riportato da Allen (1989) per suoli naturali (tabella 7).

Na	K	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Pb	Cr	Cd
1-20	3-20	2-20	5-20	5-100	0,2-2,0	0,02-0,3,0	5-80	5-500	2-20	10-200	0,03-0,30
mg/g p.s	mg/g p.s	mg/g p.s	mg/g p.s	mg/g p.s	mg/g p.s	mg/g p.s	μg/g p.s	μg/g p.s	μg/g p.s	μg/g p.s	μg/g p.s

Tabella 7: Intervalli di concentrazione di nutrienti ed elementi in traccia riportati da Allen (1989) per suoli naturali.

❖ Na, K, Mg, Ca

Differenze significative nel tempo sono state riscontrate (figure 31, 32) per la concentrazione totale di Na, Mg, K ($P < 0,001$) e Ca ($P < 0,05$). Na e Ca hanno presentato mediamente una concentrazione più bassa in primavera (3 e 20 mg/g p.s., rispettivamente per Na e Ca) rispetto all'autunno (6 e 28 mg/g p.s., rispettivamente per Na e Ca); per il Mg si verifica un andamento opposto, con una concentrazione media più alta in primavera (circa 6 mg/g p.s.) rispetto all'autunno (circa 4 mg/g p.s.). Relativamente alla frazione disponibile, differenze significative nel tempo sono state riscontrate per Na, K e Mg ($P < 0,001$). Per il Na la maggiore disponibilità si è osservata in primavera, per gli altri due elementi in autunno.

Tra le due regioni, le concentrazioni totali e disponibili di Na, K e Mg, sono risultate significativamente ($P < 0,001$) differenti, con concentrazioni mediamente più alte in Campania che in Toscana.

Complessivamente, i suoli lungo i transetti di ciascuna regione non hanno mostrato, sia per la concentrazione totale che per la frazione disponibile, differenze significative nel contenuto di Na, K, Mg e Ca. E' possibile comunque mettere in evidenza alcuni trend. In particolare, Na e K (figura 31) per il campionamento autunnale presentano concentrazioni totali più basse nei punti del transetto più vicini alla strada (C1 e T1), sebbene tale differenza risulti significativa ($P = 0,05$) solo in Toscana per il Na e in Campania per il K. Il suolo del sito remoto campano (C5) presenta in assoluto le più basse ($P = 0,05$) concentrazioni di Na e K, quello toscano (T5) in assoluto presenta le più alte ($P = 0,05$) concentrazioni, verosimilmente attribuibili alla vicinanza del mare. Un trend opposto si osserva invece per Mg e Ca (figura 32), per i quali i punti del transetto più vicini alla strada (C1 e T1) presentano, in entrambi i campionamenti e in entrambe le regioni, mediamente concentrazioni totali più alte rispetto agli altri punti (C2, C3 e T2, T3), con differenze significative ($P = 0,05$) per il solo campionamento autunnale. Questi dati sembrano confermare la possibile origine legata al traffico veicolare di Ca e Mg, utilizzati negli additivi per gli oli dei motori (Cardle et al., 1997). Per il Ca, in particolare, si osserva in entrambi i campionamenti un superamento del valore massimo riportato da Allen.

Sia per il Mg che per il Ca (concentrazione totale e frazione disponibile), il sito periurbano toscano (T4) presenta concentrazioni più alte ($P = 0,05$) rispetto al sito remoto (T5); un trend opposto si osserva tra il sito periurbano (C4) e il sito remoto (C5) campano ($P = 0,05$).

❖ Fe, Mn, Zn, Cu

Differenze significative nel tempo sono state riscontrate (figure 33, 34) per la concentrazione totale di Zn ($P < 0,001$) e Cu ($P < 0,05$) e per la frazione disponibile di Mn ($P < 0,001$), con concentrazioni mediamente più alte nel campionamento primaverile.

Le concentrazioni totali e disponibili di Fe, Mn, Zn e Cu misurate nelle due regioni sono risultate significativamente differenti ($P < 0,001$), con valori mediamente più elevati nei siti campani.

I suoli del transetto urbano campano mostrano concentrazioni totali sia di Fe che di Mn confrontabili (figura 33); quelli del transetto toscano presentano valori più bassi ($P = 0,05$) nel punto più vicino alla strada (T1). I transetti urbani, in ciascuna regione, presentano comunque concentrazioni più alte ($P = 0,05$) rispetto ai siti periurbani (C4 e T4) e controllo (C5 e T5); fa eccezione il Mn, che, in assoluto, mostra le più alte concentrazioni totali (1,19 e 1,07 mg/g p.s., rispettivamente per il campionamento primaverile e autunnale) nel sito remoto toscano (T5). Questo

dato è in accordo con quanto riscontrato per le foglie, confermando come plausibile fonte di contaminazione da Mn un'attività industriale per la produzione di acciai al Si-Mn (Loppi e Pirintsos 2003). Senza dubbio le concentrazioni di Mn misurate nel suolo sono influenzate anche dalla caduta di lettiera, a sua volta arricchita di questo elemento. Le più alte concentrazioni di Fe nei suoli dei siti urbani sono verosimilmente legate al traffico veicolare.

Per la concentrazione totale di Zn (figura 34), in Campania, si può osservare un trend confrontabile con quello descritto per Fe e Mn; in Toscana, invece, il punto più vicino alla strada (T1) presenta la concentrazione più alta ($P = 0,05$), con valori circa $\frac{1}{3}$ superiori a quelli degli altri punti del transetto (T2, T3).

Per la concentrazione totale di Cu (figura 34), in entrambe le regioni e in entrambi i campionamenti, i valori misurati nei punti dei transetti più prossimi alla strada (C1 e T1) sono risultati circa doppi rispetto a quelli degli altri siti della stessa regione. Le concentrazioni più alte di Zn e Cu nei suoli prelevati in prossimità di strade ad elevato flusso di traffico veicolare sono attribuibili al fatto che, con la riduzione del consumo di benzine contenenti Pb, il particolato atmosferico si è arricchito prevalentemente di altri metalli tra cui, appunto Zn e Cu (Monaci et al., 2000).

Mediamente la frazione disponibile di Fe, Mn, Zn e Cu (figure 33, 34) riflette la concentrazione totale di questi elementi, che tranne per il Cu, non ha mai superato quella di suoli naturali (Allen, 1989). Si osserva però per il Fe e il Cu, una elevata disponibilità nei siti C2, C3 e C4 della Campania e per il Mn una elevata disponibilità nel sito remoto della Toscana (T5). Verosimilmente la elevata disponibilità di Fe e Cu può essere attribuita al pH subacido dei suoli delle aree campane interessate e acido del sito remoto toscano. A questi valori di pH, infatti, Fe, Cu e Mn presentano una elevata solubilità.

❖ Ni, Pb, Cr, Cd

Le concentrazioni totali di Cr, Cd e Ni e la frazione disponibile di Ni sono risultate più alte ($P < 0,01$) in primavera che in autunno (figure 35, 36).

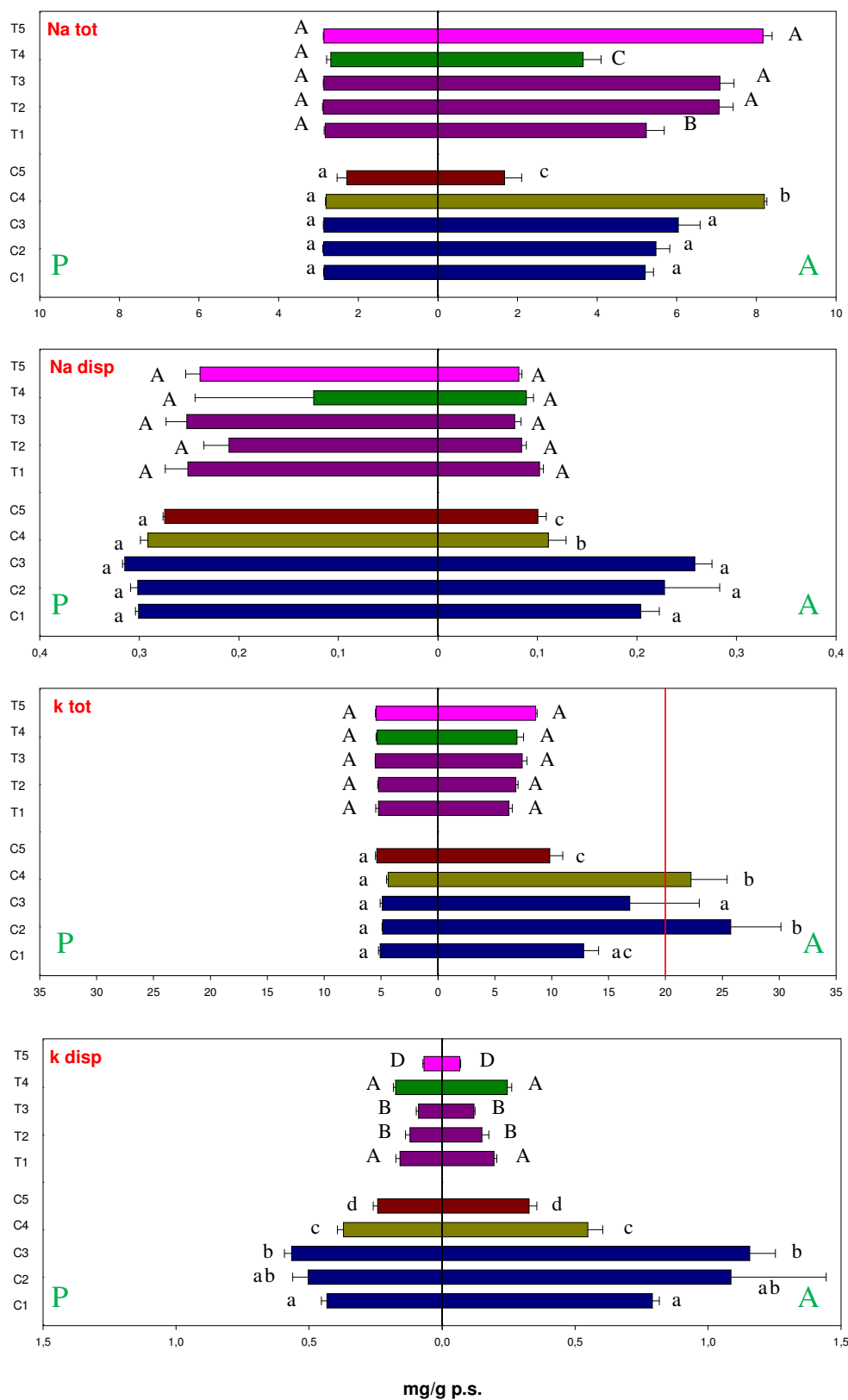
Sia per la concentrazione totale che per la frazione disponibile, mediamente i siti toscani hanno mostrato valori di Ni e Cr più alti ($P < 0,001$) rispetto ai siti campani e valori di Pb e Cd più bassi ($P = 0,002$ e $P < 0,001$, rispettivamente).

Le concentrazioni totali e disponibili di Ni e Cr (figure 35, 36) presentano, per le due regioni, gli stessi trend. Nei siti toscani in particolare, il punto del transetto più lontano dalla strada (T3) mostra le concentrazioni totali in assoluto più alte ($P = 0,05$), ovvero 42,9 e 84,7 $\mu\text{g/g p.s.}$, rispettivamente per Ni e Cr; poco più basse ($P = 0,05$) risultano le concentrazioni misurate a Cala Violina (T5), ovvero 32,6 e 65,0 $\mu\text{g/g p.s.}$, rispettivamente. Entrambi gli elementi presentano una disponibilità

mediamente doppia a Cala Violina, rispetto agli altri siti della regione. In Campania, le concentrazioni totali di Ni e Cr più alte in assoluto ($P = 0,05$) sono state misurate nel sito remoto (C5), ma tale situazione non si osserva per la frazione disponibile. Le concentrazioni di Cr misurate in Campania risultano confrontabili con quelle riportate da Maisto e collaboratori (2004) per suoli di aree remote della stessa regione.

Il Pb (figura 35), sia per la concentrazione totale che per la frazione disponibile, presenta i più alti valori ($P = 0,05$) nei suoli dei punti del transetto più prossimi alla strada, con un superamento, per il totale, del valore massimo riportato da Allen per suoli naturali di quasi un ordine di grandezza. Anche se di minore entità, questo superamento si è verificato anche nei siti periurbani (C4 e T4) e remoti (C5 e T5).

Il Cd (figura 36) ha mostrato, per i transetti urbani, un trend che indica concentrazioni più alte ($P = 0,05$) nei punti più vicini alla strada. In assoluto, però, le più alte concentrazioni totali di questo elemento sono state riscontrate ad Ottati ($0,51 \mu\text{g/g p.s.}$, mediamente), con superamenti di anche 3 volte il valore di riferimento di Allen. I valori misurati per il Cd sono risultati comunque più bassi rispetto a quelli riportati da Maisto e collaboratori (2004) per aree remote campane. La frazione disponibile di questo elemento è risultata sempre al di sotto del limite di rilevabilità della strumentazione utilizzata.



Parco di Capodimonte
 Astroni
 Ottati
 Villa Patrizia
 Belcaro
 Cala Violina

Figura 31: Concentrazione di Na e K misurate nel campionamento primaverile (P) e autunnale (A), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è indicata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore di riferimento riportato da Allen (1989) per suoli naturali. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

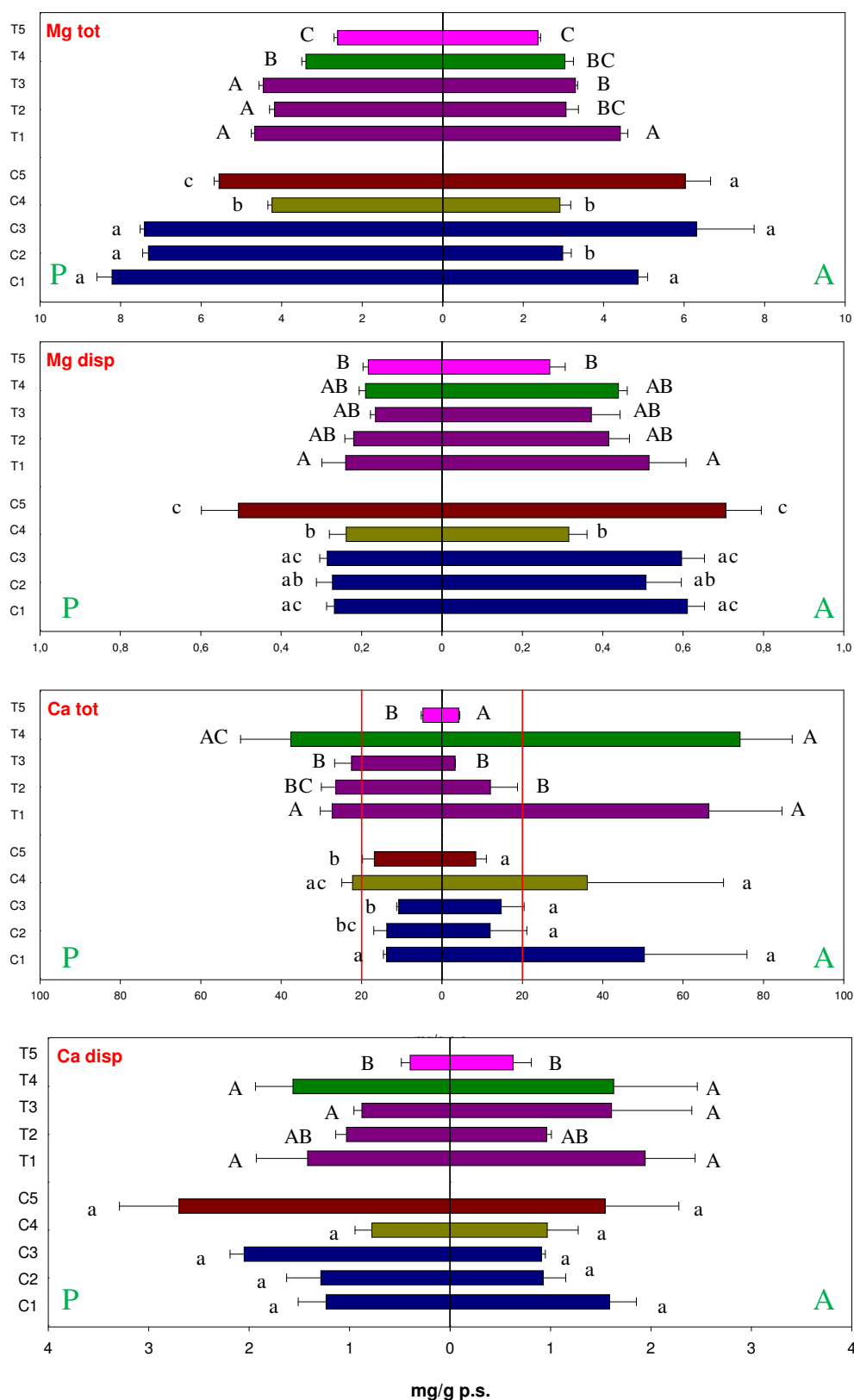


Figura 32: Concentrazione di Mg e Ca misurate nel campionamento primaverile (P) e autunnale (A), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è indicata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore di riferimento riportato da Allen (1989) per suoli naturali. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

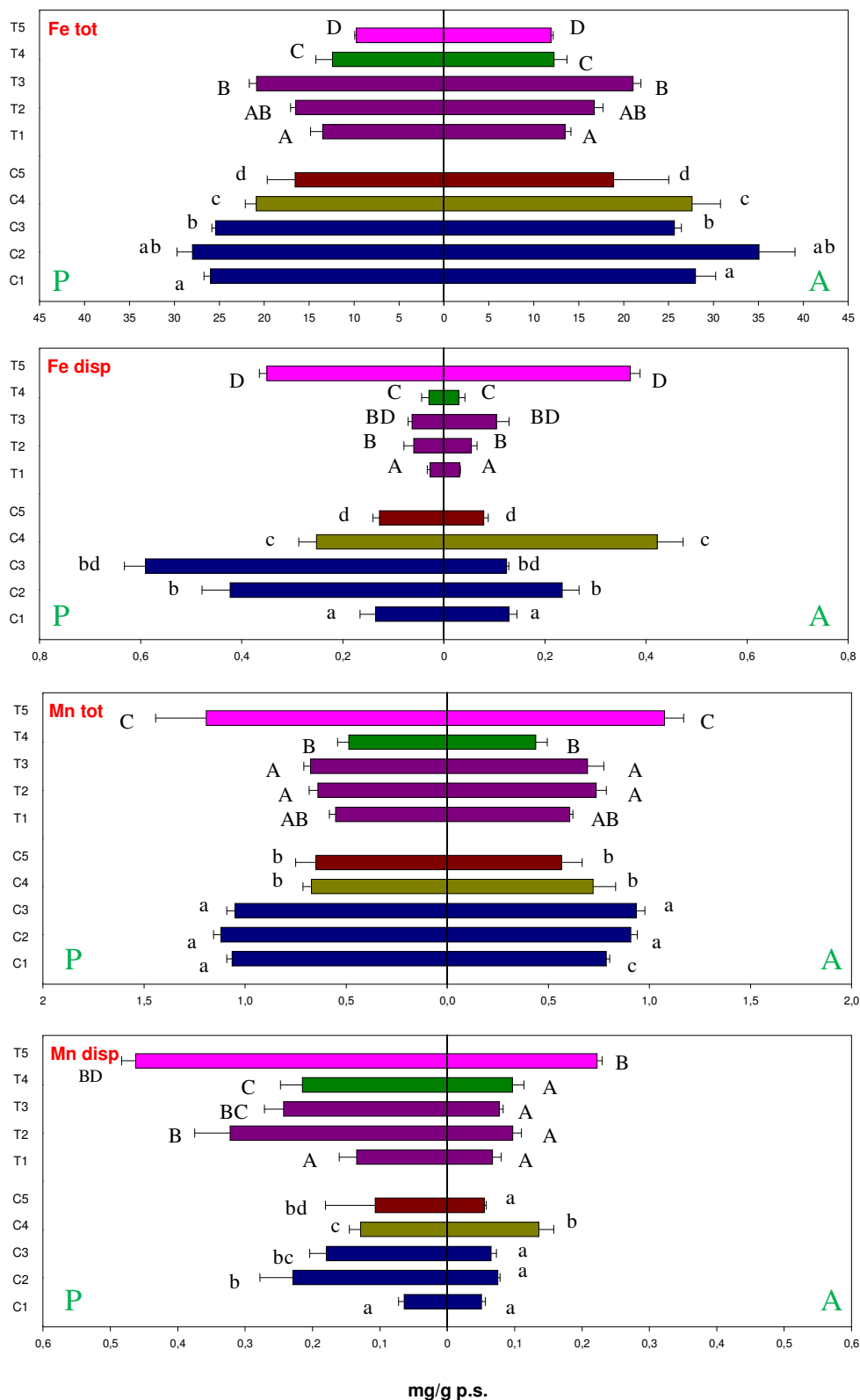
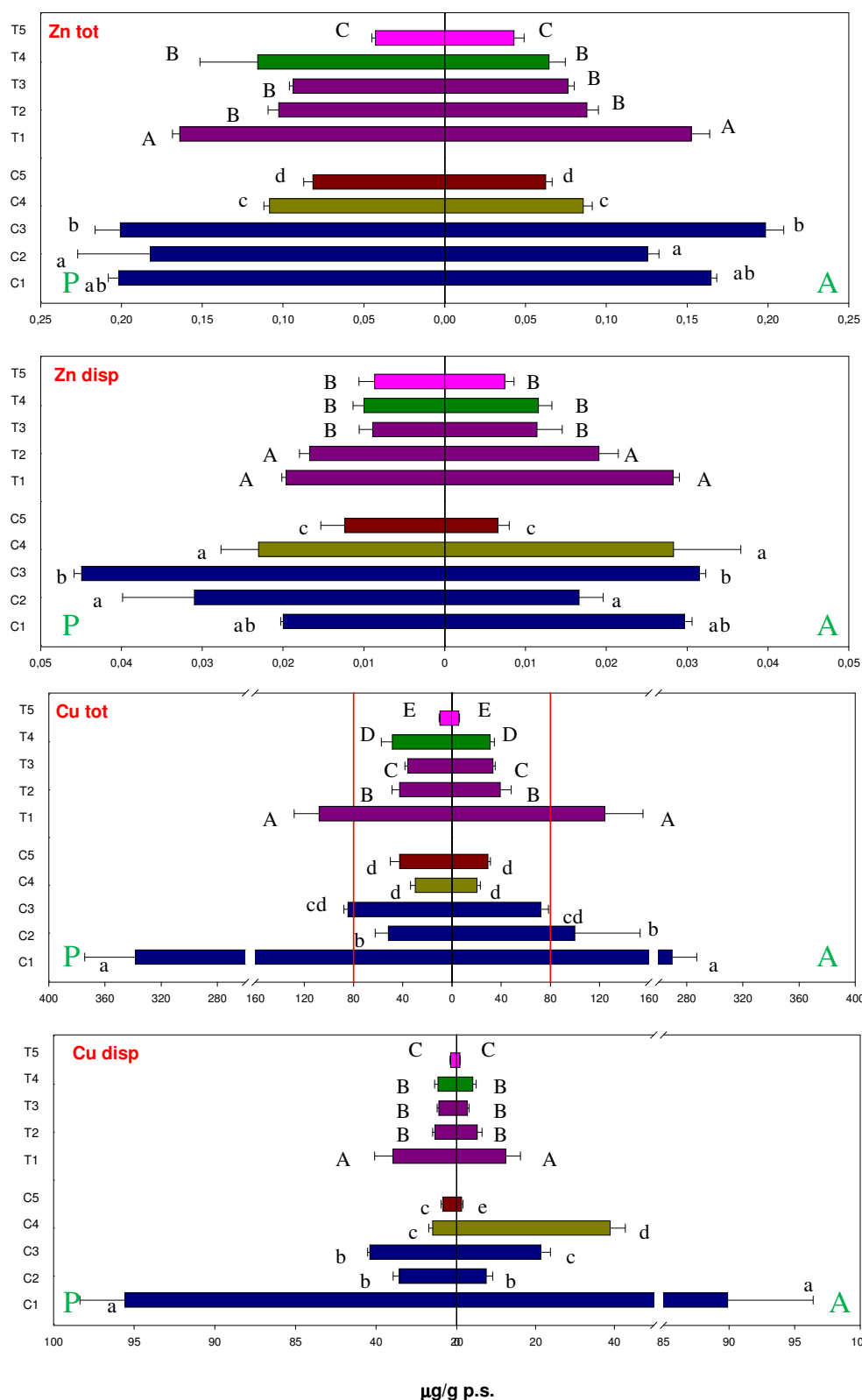
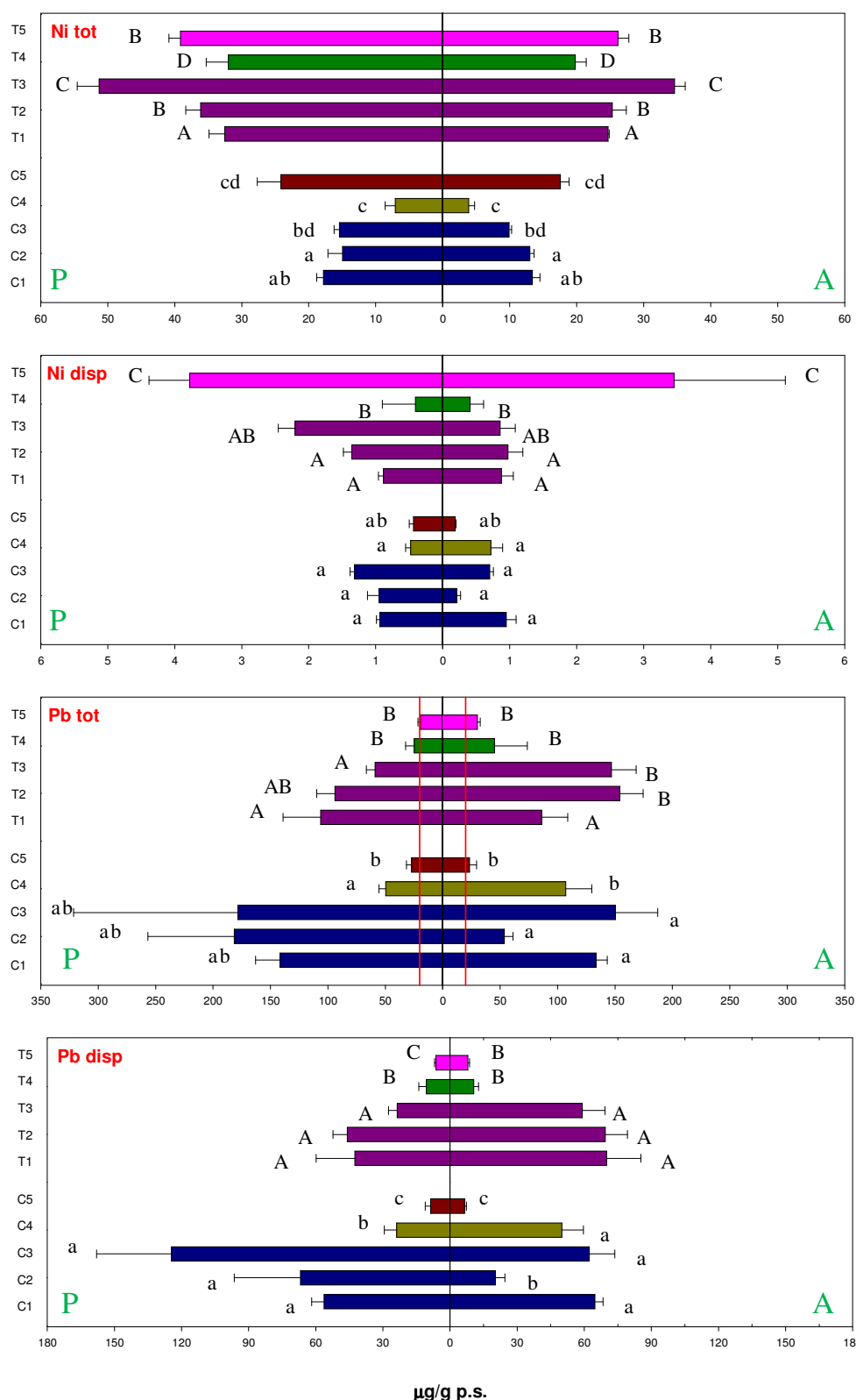


Figura 33: Concentrazione di Fe e Mn misurate nel campionamento primaverile (P) e autunnale (A), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è indicata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore di riferimento riportato da Allen (1989) per suoli naturali. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.



Parco di Capodimonte
 Astroni
 Ottati
 Villa Patrizia
 Belcaro
 Cala Violina

Figura 34: Concentrazione di Zn e Cu misurate nel campionamento primaverile (P) e autunnale (A), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è indicata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore di riferimento riportato da Allen (1989) per suoli naturali. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.



Parco di Capodimonte
 Astroni
 Ottati
 Villa Patrizia
 Belcaro
 Cala Violina

Figura 35: Concentrazione di Ni e Pb misurate nel campionamento primaverile (P) e autunnale (A), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è indicata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. La linea rossa indica il valore di riferimento riportato da Allen (1989) per suoli naturali. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

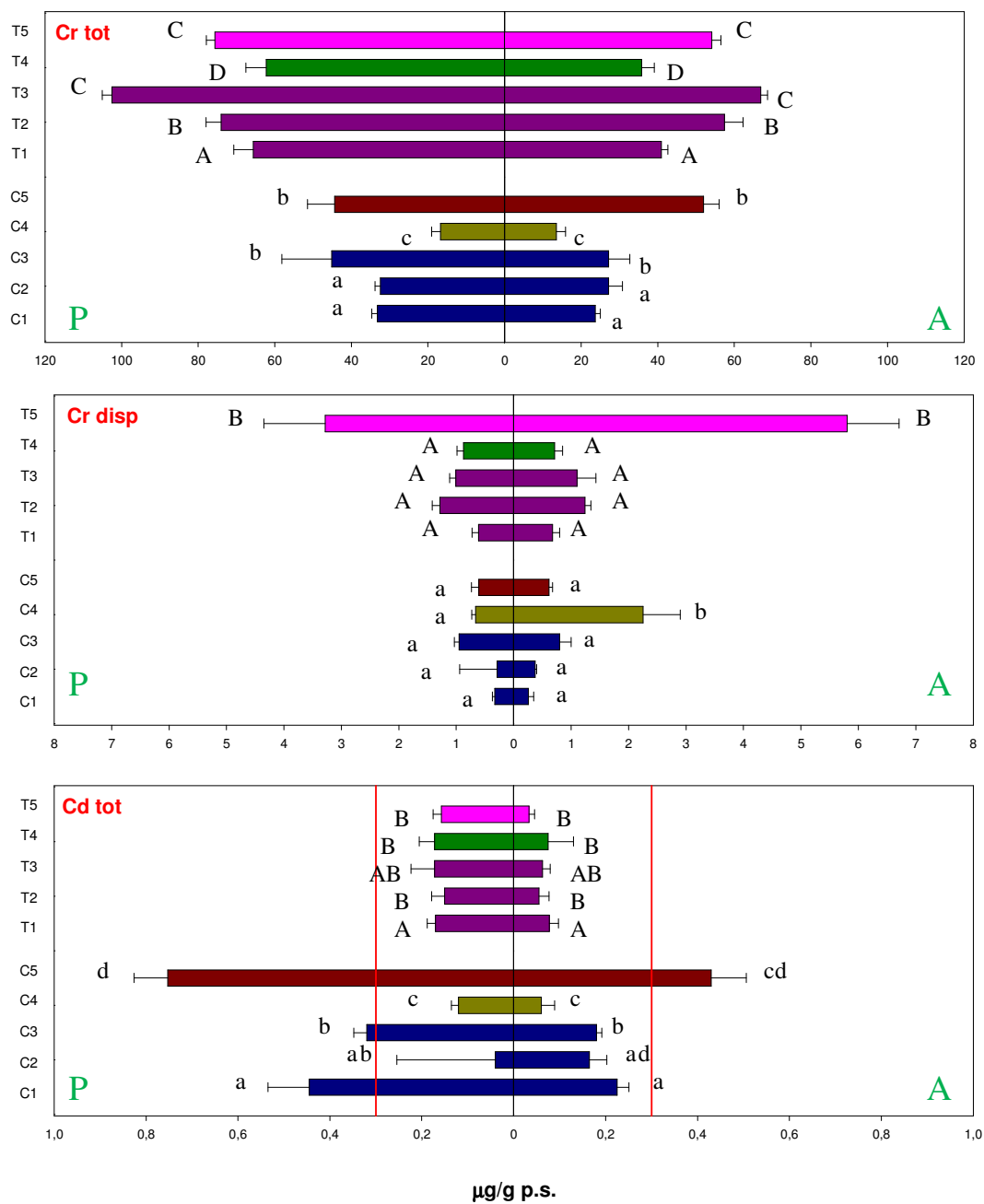


Figura 36: Concentrazione di Cr e Cd (totale e disponibile) nei suoli dei siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e. s. La linea rossa indica il valore riportato di riferimento (Allen, 1989). Le lettere indicano la significatività delle differenze separatamente per le due regioni.

Correlazioni positive tra il contenuto totale e frazione disponibile di elementi misurati nei suoli studiati, sono state riscontrate per Ca ($P \leq 0,05$), Fe, Cr ($P \leq 0,001$), Zn, Cu, Ni e Pb ($P \leq 0,0001$). Solo il Na ha mostrato una correlazione negativa ($P \leq 0,0001$) tra la concentrazione totale e la frazione disponibile.

Numerose sono le correlazioni riscontrate tra elementi, separatamente per la concentrazione totale e per la frazione disponibile (figure 37, 38). Interessanti risultano le correlazioni positive e significative (figura 37) tra Cu, Zn, Mn, Fe e Mg col Pb, poiché ciò rafforza l'ipotesi di un'origine comune di questi elementi, attribuibile al traffico veicolare. Relativamente alla frazione disponibile, queste correlazioni risultano confermate solo per Zn, Cu e Ni. Non ritorna la correlazione col Mg, ma si riscontra una correlazione positiva col Ca, come precedentemente discusso. E' da precisare che la concentrazione disponibile degli elementi non è funzione solo della concentrazione totale, ma di numerose altre caratteristiche del suolo, quali tessitura, sostanza organica, pH, capacità di scambio ionico, tutte proprietà verosimilmente variabili nelle aree investigate.

Na	1											
K	0,667	1										
Mg	-0,481	-0,388	1									
Ca	-0,327	-0,283	n.s.	1								
Fe	0,248	n.s.	0,391	-0,234	1							
Mn	0,273	n.s.	n.s.	-0,424	0,501	1						
Zn	n.s.	-0,226	0,603	0,288	0,521	0,267	1					
Cu	n.s.	n.s.	0,597	0,278	0,421	n.s.	0,819	1				
Ni	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,507	n.s.	-0,349	n.s.	1			
Pb	0,338	n.s.	0,316	n.s.	0,509	0,298	0,606	0,540	n.s.	1		
Cd	-0,574	-0,314	0,672	n.s.	0,240	n.s.	0,358	0,454	n.s.	n.s.	1	
Cr	n.s.	-0,232	n.s.	n.s.	-0,422	n.s.	-0,328	n.s.	0,907	n.s.	n.s.	1
	Na	K	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Pb	Cd	Cr

$P \leq 0,05$

$P \leq 0,01$

$P \leq 0,001$

$P \leq 0,0001$

Figura 37: Matrice di correlazione tra la concentrazione totale di elementi nei suoli.

Na disp	1											
K disp	0,364	1										
Mg disp	-0,221	0,502	1									
Ca disp	n.s.	0,244	0,256	1								
Fe disp	0,293	0,302	n.s.	n.s.	1							
Mn disp	0,218	-0,506	-0,556	n.s.	0,248	1						
Zn disp	0,381	0,614	0,285	0,267	0,231	n.s.	1					
Cu disp	0,433	0,661	n.s.	0,278	n.s.	-0,279	0,779	1				
Ni disp	n.s.	-0,416	-0,429	n.s.	n.s.	0,554	n.s.	n.s.	1			
Pb disp	n.s.	0,350	n.s.	0,300	n.s.	n.s.	0,774	0,640	0,231	1		
Cr disp	n.s.	-0,458	-0,236	n.s.	0,289	0,733	n.s.	-0,287	0,487	n.s.	1	
	Na disp	K disp	Mg disp	Ca disp	Fe disp	Mn disp	Zn disp	Cu disp	Ni disp	Pb disp	Cr disp	

P≤0,05

P≤0,01

P≤0,001

P≤0,0001

Figura 38: Matrice di correlazione tra la frazione disponibile di elementi nei suoli.

🚧 Concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici

I suoli della Campania hanno evidenziato concentrazioni di IPA (da 163 a 5019 ng/g p.s.) mediamente più alte ($P = 0,05$) rispetto a quelli toscani (da 126 a 1103 ng/g p.s.). Le differenze di concentrazione tra il campionamento primaverile e quello autunnale (figura 39a, b), non sono risultate significative.

I dati delle concentrazioni di IPA nei suoli hanno evidenziato una netta separazione spaziale tra aree a diverso impatto antropico: infatti i suoli dei transetti urbani hanno mostrato concentrazioni di IPA da 5 a 30 volte più alte di quelle misurate nel sito remoto, in Campania, e da 2 a 9 volte in Toscana: i suoli più prossimi alla strada (C1 e T1) hanno presentato le più alte concentrazioni di IPA ($P = 0,05$), fatta eccezione per i suoli del sito C3. Anche nei suoli periurbani C4 e T4 sono state misurate concentrazioni di IPA maggiori che nei suoli remoti (figura 39a, b). Le elevate concentrazioni di IPA misurate nel sito C3 del transetto campano sono attribuibili ad un fenomeno di contaminazione locale del suolo, verosimilmente dovuto a sversamenti di materiali di risulta e sostanze bituminose riscontrati nell'area di indagine, nei pressi dei punti dove è stato effettuato il campionamento di suolo.

Le concentrazioni di IPA misurate nei suoli urbani e periurbani sono confrontabili con i valori riportati per le stesse tipologie di suolo da Manzo et al (2008) e con i valori riportati per suoli soggetti ad elevati input atmosferici (Krauss et al., 2000). Valori di concentrazione di IPA di circa 100 ng/g p.s., sono stati stimati da Edwards (1983) e Trapido (1999) per suoli di aree rurali. Le più alte concentrazioni misurate nei suoli urbani e periurbani rispetto ai remoti suggeriscono un grosso

contributo della deposizione atmosferica, essendo il suolo esposto alle deposizioni per lunghi periodi (Maisto et al., 2006).

Il trend delle concentrazioni di IPA osservato per i suoli riflette quello osservato per le foglie ad indicare l'influenza delle deposizioni atmosferiche sui contenuti di questi inquinanti nelle due matrici analizzate. Gli apporti di IPA al suolo derivano non solo dalle deposizioni atmosferiche ma anche dagli input delle particelle depositate sul tronco degli alberi, che si accumulano al suolo in seguito a fenomeni di dilavamento del tronco, e dagli apporti di lettiera.

È interessante notare che il trend osservato per gli IPA nel suolo riflette quello di Pb e Zn, in accordo con quanto riportato da Maisto e collaboratori (2006). Inoltre è stata evidenziata una correlazione positiva ($P \leq 0,001$) tra la concentrazione totale di IPA e quella di Fe, Mn, Zn, Mg, Cu e Pb (tabella 8), supportando ulteriormente quanto già evidenziato per le foglie, vale a dire una fonte comune di emissione per questi composti attribuibile al traffico veicolare. Anche altri autori riportano una correlazione positiva tra il contenuto di IPA ed elementi in traccia nel suolo e il flusso di traffico veicolare (Bloemen et al., 1995; Chen et al., 1997; Pichtel et al., 2000). Correlazioni negative ($P \leq 0,001$) sono state evidenziate tra la concentrazione totale di IPA e quella di Ni e Cr (tabella 8). Infine, il contenuto totale di IPA è risultato correlato positivamente (tabella 8) al contenuto di sostanza organica ($P \leq 0,01$): numerosi studi confermano il ruolo centrale della sostanza organica sull'accumulo di IPA nei suoli (Pan et al., 2006). Le concentrazioni di IPA sono in relazione non solo agli input al suolo, ma anche alle caratteristiche chimico-fisiche del suolo come contenuto in sostanza organica e in argilla, la cui presenza influenza l'adsorbimento di IPA al suolo.

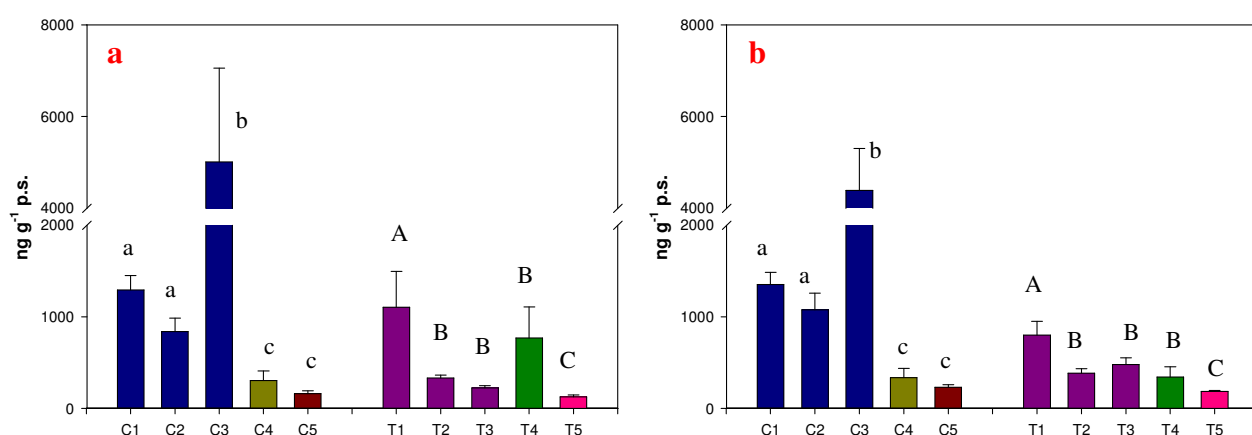


Figura 39: Concentrazioni di IPA totali, per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

	Fe	Mn	Zn	Mg	Cu	Ni	Pb	Cr	Sostanza organica
IPA	0,473	0,255	0,804	0,412	0,730	-0,374	0,598	-0,349	0,272

Tabella 8: Coefficienti di correlazione tra IPA e metalli in traccia e tra IPA e sostanza organica.

Analogamente a quanto fatto per le foglie, gli IPA determinati nel suolo sono stati suddivisi in base al peso molecolare (LMW, MMW e HMW rispettivamente a basso, medio e alto peso molecolare) (figura 40) secondo quanto riportato da Harner e Bidleman (1998). Gli IPA a basso peso molecolare sono quelli meno rappresentati nei suoli di entrambe le regioni, raggiungendo mediamente percentuali dello 0,5%. Mediamente gli IPA a medio peso molecolare rappresentano il circa il 30% degli IPA totali misurati nei suoli, quelli ad alto peso circa il 70%. La maggiore abbondanza di IPA a medio ma soprattutto ad alto peso molecolare è coerente con l'elevata complessità strutturale di questi composti, che ne determina una elevata resistenza alla degradazione e, conseguentemente, un'elevata persistenza nei suoli (Wilde Jones, 1995; Maliszewska-Kordybach, 1999).

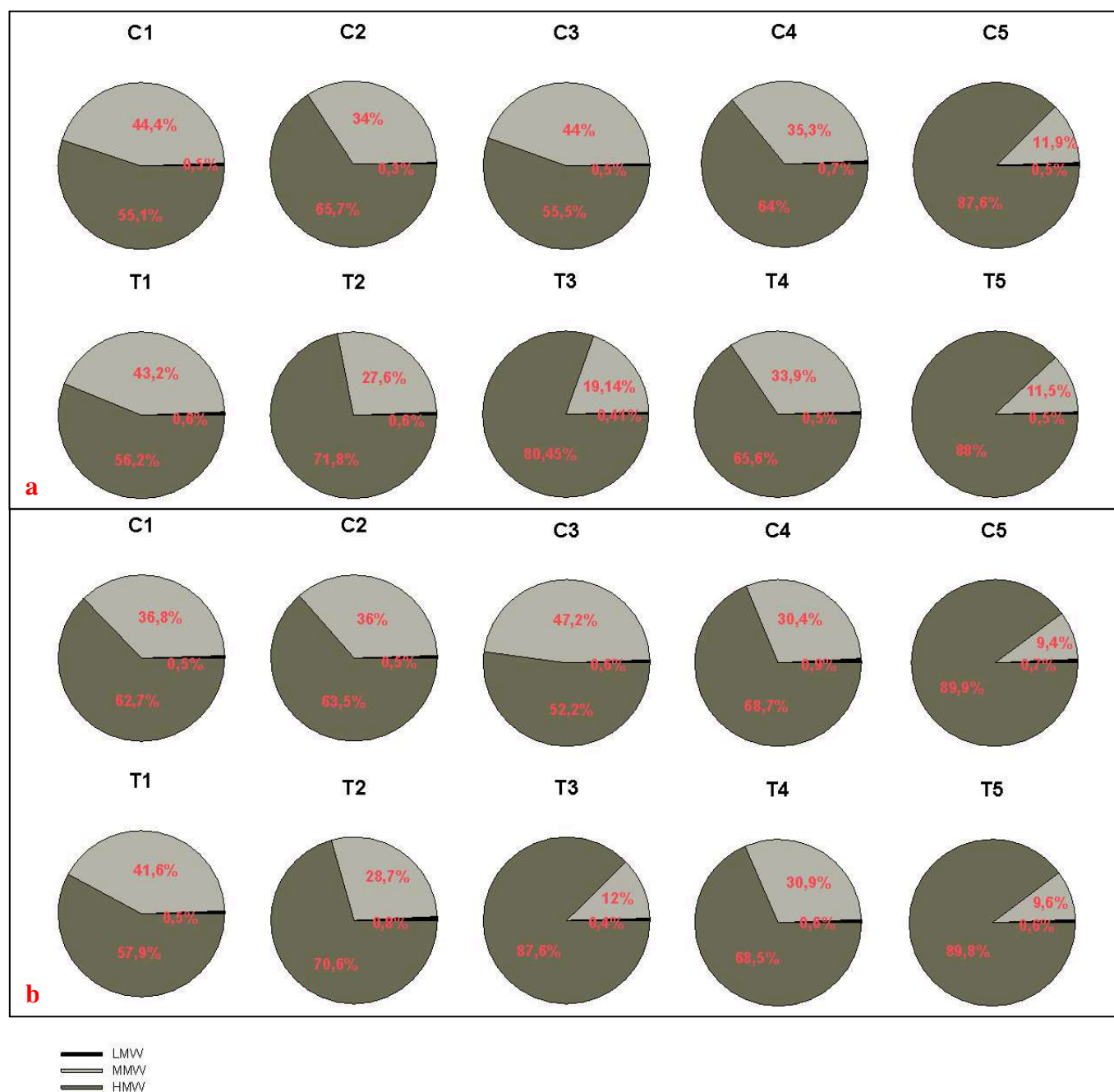


Figura 40: IPA a basso (LMW), medio (MMW) e alto (HMW) peso molecolare, come percentuale degli IPA totali, in suoli della Campania e della Toscana. .Il riquadro in alto (a) riporta i dati del campionamento primaverile, quello in basso (b) i dati del campionamento autunnale.

Relazioni pianta-suolo

Il confronto tra le concentrazioni di elementi ed IPA misurate nelle foglie e nei suoli può fornire utili indicazioni sulle origini di questi inquinanti e sui loro meccanismi di diffusione tra il comparto abiotico e quello biotico di un ecosistema.

Correlazioni positive e significative tra la concentrazione totale misurata nel suolo e quella misurata nelle foglie sono state riscontrate per Pb ($P \leq 0,0001$), Ca, Mn ($P \leq 0,001$), Cu, Ni e IPA totali ($P \leq 0,01$). Tale risultato può indicare un'origine comune di questi inquinanti nelle due matrici considerate, come proposto da Maisto e collaboratori (2004) che, trovando correlazioni positive tra le concentrazioni di Cu e Pb nelle foglie e nel suolo, ipotizzano un contributo atmosferico per entrambe le matrici. Correlazioni negative sono state invece riscontrate per K e Cd ($P \leq 0,05$).

La concentrazione di elementi misurata nelle foglie è stata anche messa in relazione con la frazione disponibile del suolo. In questo caso si sono riscontrate correlazioni positive per Mn ($P \leq 0,01$), Na e Pb ($P \leq 0,0001$). Per il Pb è riportata (Violante, 2002) una bassa traslocazione, dovuta ad un parziale blocco di questo elemento a livello delle cellule dell'endoderma della radice (Wierzbicka, 1987), pertanto è più plausibile considerare per il Pb un'origine atmosferica. Non va trascurato, infatti, che avendo utilizzato foglie non lavate, la deposizione atmosferica può incidere notevolmente sui risultati ottenuti.

Mediamente, i trend osservati per le foglie coincidono quindi con quelli del suolo, sebbene vi siano alcune differenze. Ad esempio, le maggiori concentrazioni di Ca misurate nelle foglie della Toscana rispetto a quelle della Campania (figura 13) non sono state misurate anche per il suolo (figura 32), sia per la concentrazione totale che per la frazione disponibile. Anche Fe, Zn, Ni e Cr mostrano nei transesti urbani trend di accumulo diversi tra suolo e foglie (figure 13, 14, 35, 36).

Nelle foglie e nei suoli delle aree indagate sono stati confrontati i profili dei singoli IPA determinati (figure 41, 42), utilizzando per i suoli una media dei due campionamenti effettuati.

In tutte le aree di studio gli IPA più rappresentati, espressi come percento delle concentrazioni di IPA totali, nelle foglie sono fenantrene, fluorantene e pirene, IPA a medio peso molecolare, in accordo con quanto evidenziato in precedenti studi su foglie di leccio (Alfani et al., 2005). Questi tre composti sono stati misurati come gli IPA più abbondanti nel film organico prelevato da superfici di area urbana (Diamond et al., 2000). Particolarmente rappresentati nelle foglie, tra gli IPA ad alto peso molecolare vi sono benzo(a)pirene e coronene. Alcuni degli IPA maggiormente rappresentati (fluorante, pirene e coronene) sono abbondanti anche nelle emissioni degli scarichi veicolari.

Fluorantene, pirene e benzo(b+k+j)fluorantene sono gli IPA più rappresentati nei suoli dei siti urbani e periurbani, in accordo con quanto evidenziato in studi su suoli campani (Maisto et al 2006). Nei suoli dei siti remoti è il dibenzo(a,e)pirene l'idrocarburo più rappresentato. Alcuni studi riportano una maggiore abbondanza di IPA a basso peso molecolare in suoli urbani rispetto ad aree controllo (Yu et al., 2009), ma nei suoli studiati il contributo percentuale di questi composti è trascurabile per entrambe le tipologie di sito.

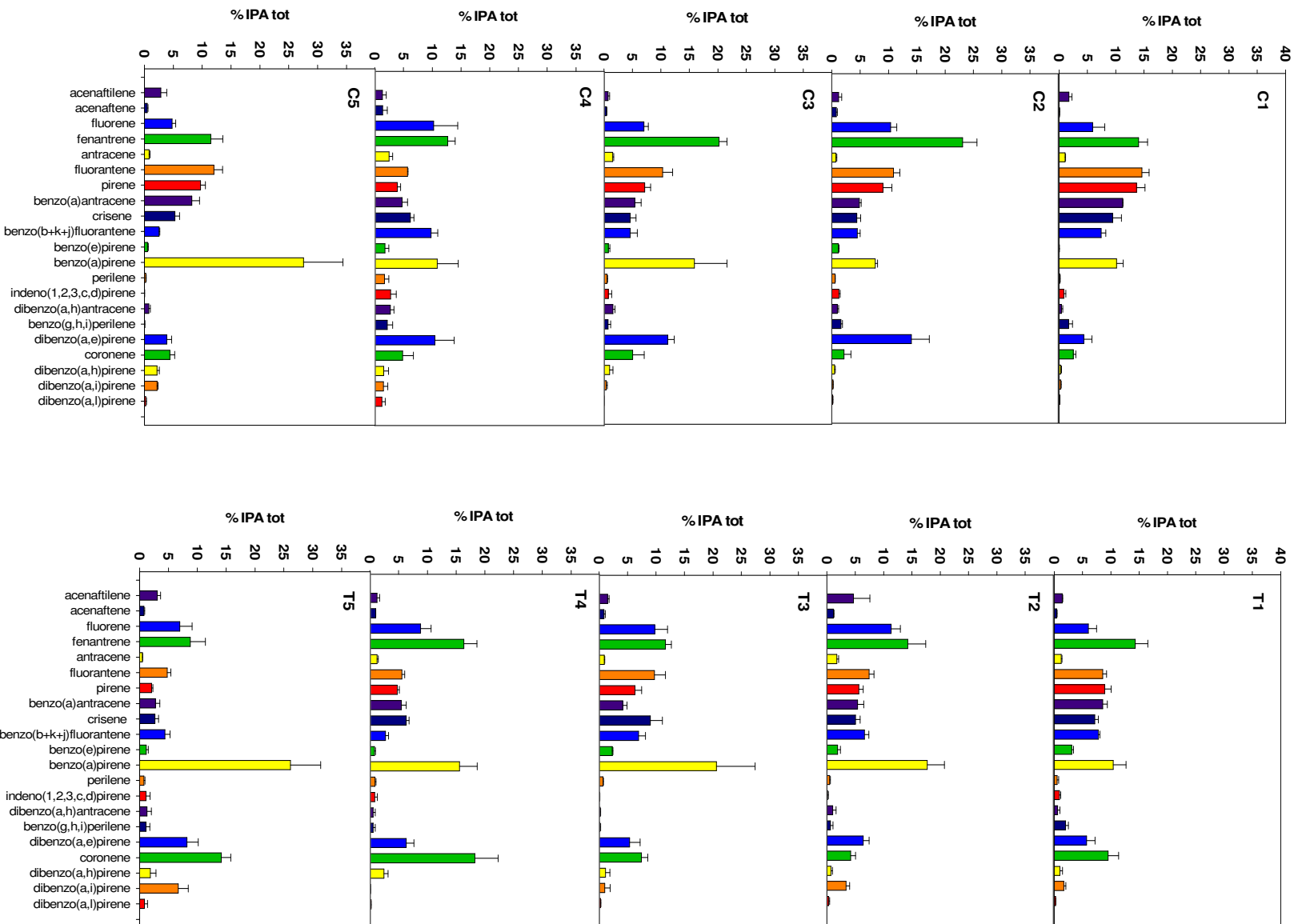


Figura 41: Profilo dei singoli IPA nelle foglie di leccio, per i siti della Campania e della Toscana. I dati sono riportati in percentuale rispetto al totale.

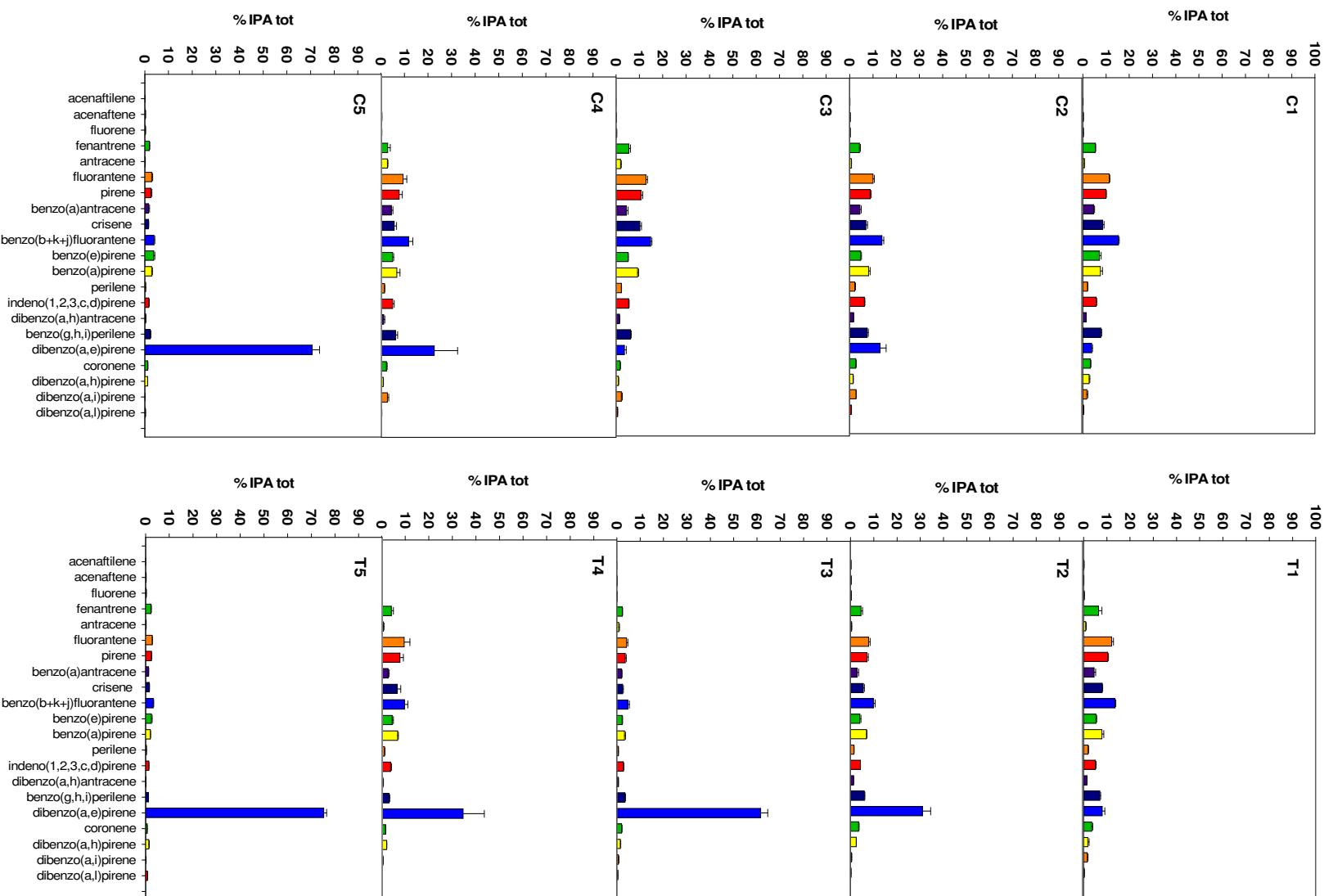


Figura 42: Profilo di accumulo degli IPA nei suoli, per i siti della Campania e della Toscana. I dati sono riportati in percentuale rispetto al totale.

➤ **Indicatori biologici**

Biomassa microbica

La biomassa microbica, espressa come carbonio microbico, non ha mostrato differenze significative tra campionamenti e regioni (figura 43). Differenze significative ($P = 0,05$) sono state invece riscontrate, tra le aree di studio, analizzate separatamente per i due campionamenti. Tra i siti campani i punti del transetto (C1,C2,C3) presentano valori confrontabili con quelli del sito periurbano (C4); il sito remoto (C5) presenta i valori più alti (3,8 mg C_{mic}/g p.s., mediamente per i due campionamenti). In Toscana è il sito intermedio del transetto (T2) a presentare i valori più alti di biomassa microbica (3,6 mg C_{mic}/g p.s. mediamente per i due campionamenti), confrontabili con quelli del sito periurbano (T4). Il sito remoto toscano T5 presenta il più basso contenuto (1,0 mg/g p.s. mediamente per i due campionamenti). I valori di biomassa microbica misurati a Cala Violina sono confrontabili con quelli riportati da Rutigliano e collaboratori (2004) per un suolo sabbioso caratterizzato da copertura a leccio, in provincia di Caserta.

I trend osservati per questo parametro riflettono mediamente quelli precedentemente mostrati (figura 28) per la sostanza organica, con la quale la biomassa microbica risulta positivamente correlata (figura 44). Tale correlazione è attribuibile al fatto che la sostanza organica rappresenta la principale risorsa trofica per i microrganismi del suolo (Bullini et al., 1998) ed inoltre conferisce al suolo caratteristiche chimico-fisiche favorevoli alla vita dei microrganismi, pertanto decrementi del contenuto di sostanza organica comportano una diminuzione della biomassa microbica (Mukhortova e Evgrafova, 2005).

Il contenuto di biomassa microbica può essere quindi considerato un buon indicatore delle variazioni del contenuto di sostanza organica nel suolo (Perucci, 1992), fornendo risposte più rapide rispetto alle variazioni di carbonio organico o del tasso di decomposizione (Nannipieri, 1984). Inoltre il rapido turnover della biomassa microbica fa sì che questo parametro possa costituire un sensibile indicatore degli effetti sul suolo dei cambiamenti climatici, della gestione delle lavorazioni, della rotazione delle colture e della tossicità di contaminanti (Rice et al., 1996).

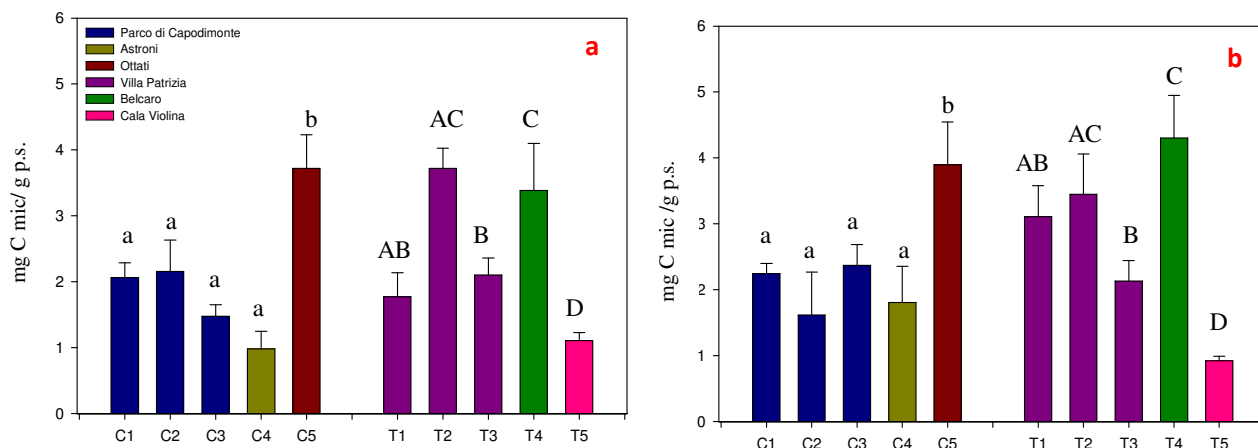


Figura 43: Carbonio microbico, per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

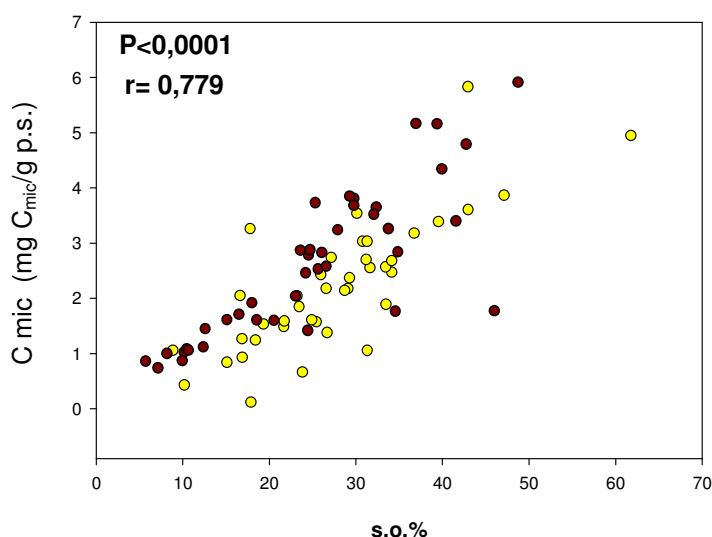


Figura 44: Correlazione tra il contenuto di sostanza organica e il carbonio microbico complessivamente per il campionamento primaverile e autunnale. In giallo sono rappresentati i siti campani, in rosso quelli toscani.

🚦 Ergosterolo

Il contenuto di ergosterolo, indicativo della biomassa fungina viva, non ha mostrato differenze significative tra campionamenti (figura 45).

Le differenze tra regioni sono risultate significative e, in particolare, i siti toscani hanno mostrato concentrazioni all'incirca doppie ($P < 0,001$) di quelli campani, anche per valori di sostanza organica comparabili. Anche l'ergosterolo, al pari della biomassa microbica, risulta influenzato dal contenuto di sostanza organica (figura 28) e ne riflette gli andamenti osservati per le aree di studio, mostrando

una correlazione positiva con questo parametro (figura 46). I funghi, infatti, analogamente ai batteri sono coinvolti, nel processo di decomposizione della sostanza organica (Paul e Clark, 1989), risultando, insieme ai batteri, i principali responsabili della degradazione e mineralizzazione dei composti organici e della produzione dell'humus. Pertanto, monitorare la biomassa fungina contribuisce a definire la qualità di un suolo.

Il sito remoto campano (C5) presenta una concentrazione quasi doppia ($P = 0,05$) rispetto a quelle dei punti del transetto; il sito periurbano (C4) ha mostrato in assoluto le concentrazioni più basse.

Tra i siti toscani il più alto contenuto di ergosterolo ($P = 0,05$) è stato misurato per il sito periurbano (T4), il più basso ($P = 0,05$) per il sito remoto. Quest'ultimo ha presentato concentrazioni di circa $\frac{1}{3}$ rispetto ai siti del transetto urbano (circa $21 \mu\text{g/g p.s.}$, mediamente per i due campionamenti). I valori misurati in Campania sono risultati mediamente più bassi di quelli riportati da Iovieno e collaboratori (2010) per suoli di due boschi di leccio di due aree protette della Campania; fa eccezione il sito remoto che presenta valori confrontabili a quelli riportati nel lavoro citato. Invece, i suoli della Toscana presentano valori decisamente maggiori di quelli riportati da Iovieno e collaboratori (ad eccezione di Cala Violina che presenta valori molto più bassi). Questo dato appare rilevante, considerato che i suoli della Toscana presentano un minor contenuto di sostanza organica dei suoli studiati. Questa maggiore abbondanza di funghi nei suoli toscani rispetto a quelli della Campania è verosimilmente legata alle diverse caratteristiche pedogenetiche tra i suoli delle due regioni e potrebbe anche essere attribuibile alle diverse condizioni climatiche, in particolare al periodo di aridità estiva praticamente irrilevante.

Il contenuto di ergosterolo è risultato negativamente correlato con la frazione disponibile del ferro ($r = -0,726$, $P \leq 0,0001$) e ciò potrebbe suggerire una particolare sensibilità dei funghi alla presenza di questo metallo.

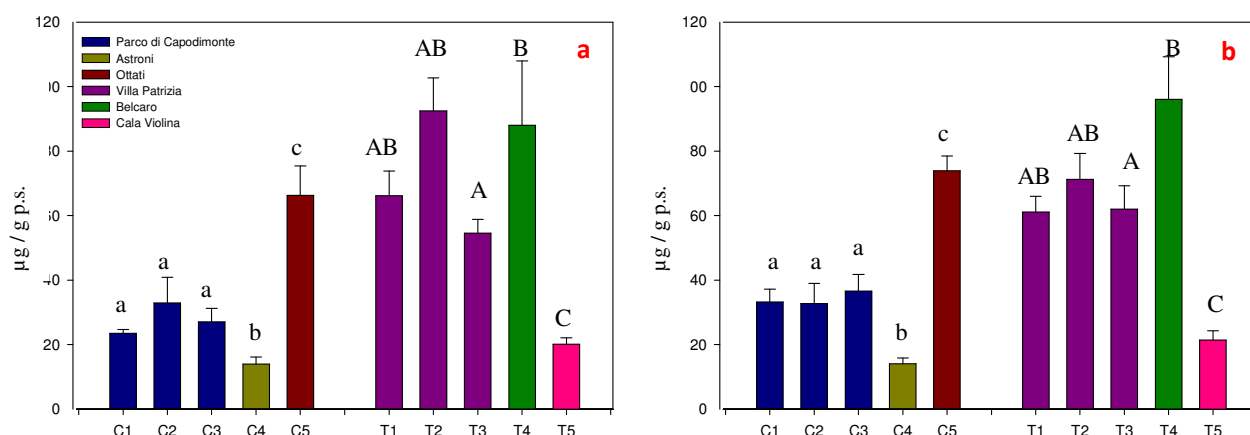


Figura 45: Biomassa fungina espressa come contenuto di ergosterolo, per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della

Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

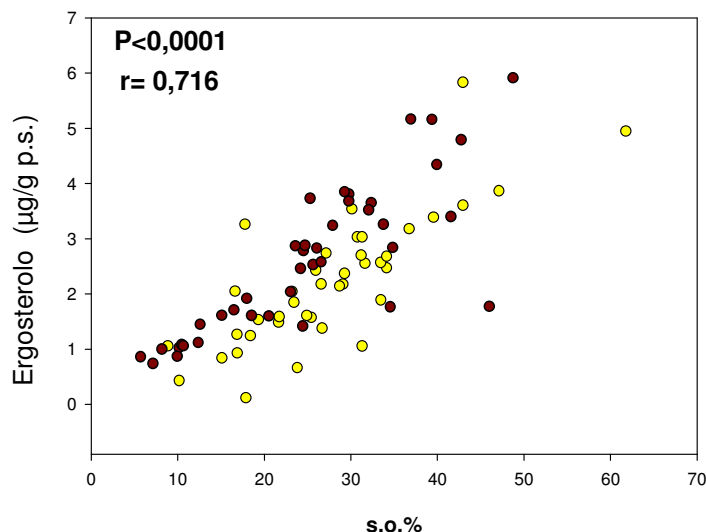


Figura 46: correlazione tra il contenuto di sostanza organica ed ergosterolo complessivamente per il campionamento primaverile e autunnale. In giallo sono rappresentati i siti campani, in rosso quelli toscani.

Attività enzimatiche

L'attività idrolasica totale non ha mostrato differenze significative tra i due campionamenti e tra regioni (figura 47). Relativamente ai transetti urbani, per ciascuna regione, non si osservano differenze significative se non nel punto più interno del transetto toscano (T3) che presenta valori più bassi. Relativamente ai siti periurbani e remoti si sono ripetuti i trend osservati per biomassa microbica ed ergosterolo. In particolare, i valori più alti ($P = 0,05$) sono stati evidenziati per il sito remoto campano (C5) e il periurbano toscano (T4), i più bassi nel sito remoto toscano (T5).

Anche l'attività β -glucosidasica (figura 48) non ha mostrato differenze tra i due campionamenti, ma sono risultate significative le differenze osservate tra regioni ($P < 0,001$): mediamente i siti campani hanno mostrato un'attività pari a circa $914 \mu\text{g/g p.s./h PNF}$, quelli toscani un'attività più bassa pari a circa $788 \mu\text{g/g p.s./h PNF}$. I trend di questa attività enzimatica relativi ai transetti non hanno mostrato, nell'ambito della stessa regione, delle differenze significative. In Campania, in particolare in primavera, il sito remoto (C5) presenta una concentrazione circa doppia rispetto ai tre punti del transetto e in assoluto i valori più alti ($P = 0,05$), pari a $1455,62 \mu\text{g/g p.s./h PNF}$. Per entrambi i campionamenti, è il sito periurbano (C4) a mostrare i valori più bassi di attività β -glucosidasica nell'ambito della regione. Gli andamenti si presentano più uniformi tra i siti toscani mostrando

concentrazioni significativamente più alte ($P=0,05$) nel sito periurbano (T4), sebbene confrontabili con quelle del transetto, e più basse ($P = 0,05$) in quello remoto (T5).

Sia per l'attività idrolasica che per quella β -glucosidasica, i risultati ottenuti nel sito remoto toscano (T5) sono confrontabili con quelli riportati in letteratura da (Rutigliano et. al, 2004).

Entrambe le attività enzimatiche risultano positivamente correlate col contenuto di sostanza organica (figure 49, 50).

Infine, sebbene le differenze osservate tra i punti del transetto campano non siano risultate significative, l'attività idrolasica totale e la β -glucosidasica presentano valori più bassi proprio nel punto più vicino alla strada. Sono questi i punti dove sono state anche misurate le più alte concentrazioni di Cu, , Cd, nonché evidenziata la maggiore disponibilità di Cu. Sebbene non vi sia una correlazione significativa tra la disponibilità di questi elementi e le due attività enzimatiche, ciò non significa che non vi siano degli effetti. La letteratura scientifica è infatti ricca di lavori che evidenziano un forte impatto della contaminazione da metalli in traccia sulle attività microbiche (a titolo di esempio: Rutigliano et al., 1993; Kuperman e Carreiro 1997; Lee et al., 2002; Mikanova, 2006; Wang et al., 2007). In condizioni non controllate, quali sono gli ecosistemi esaminati in questo lavoro, le attività microbiche possono essere influenzate da effetti sinergici di più contaminanti e dall'interazione con altri fattori ambientali che potrebbero spiegare l'assenza di correlazioni statisticamente significative con le concentrazioni dei singoli metalli.

Le due attività enzimatiche sono risultate correlate positivamente col contenuto di IPA totali ($r = 0,321$ per l'idrolasi e $r = 0,327$ per la β -glucosidasi, $P \leq 0,01$) e col Mg disponibile ($r = 0,607$ per l'idrolasi e $r = 0,635$ per la β -glucosidasi, $P \leq 0,01$).

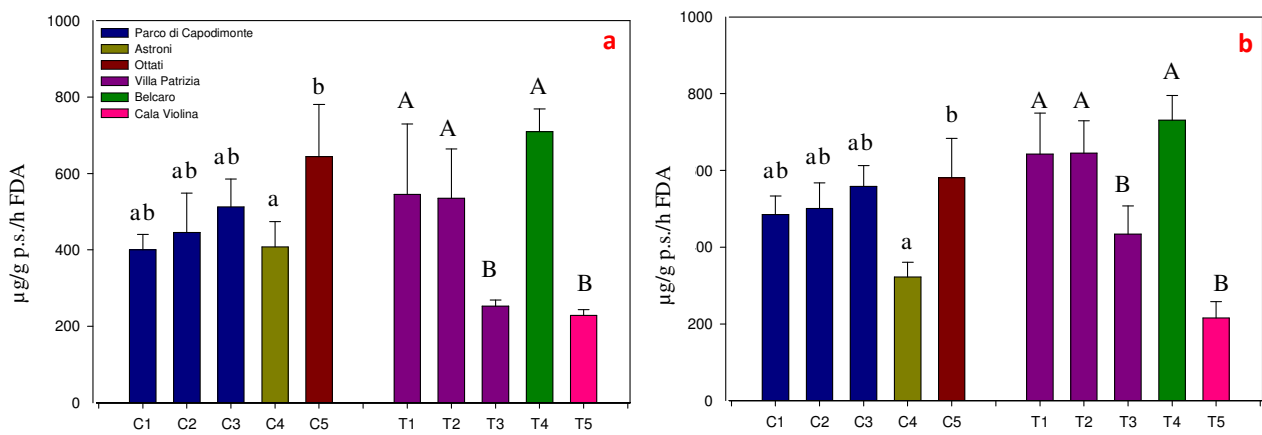


Figura 47: Attività idrolasica totale per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

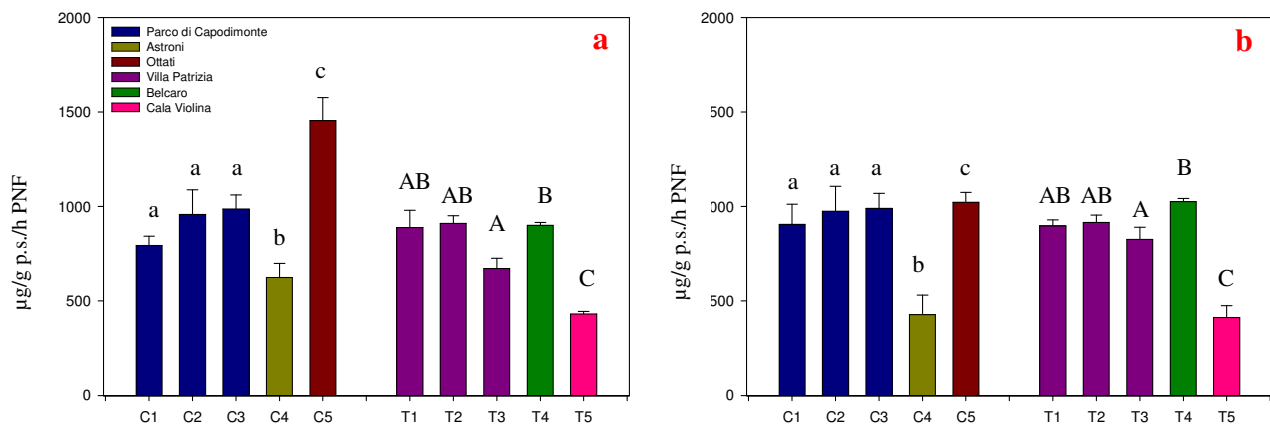


Figura 48: Attività β -glucosidasica per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b), nei suoli prelevati dai siti urbani, periurbani e remoti, della Campania e della Toscana. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

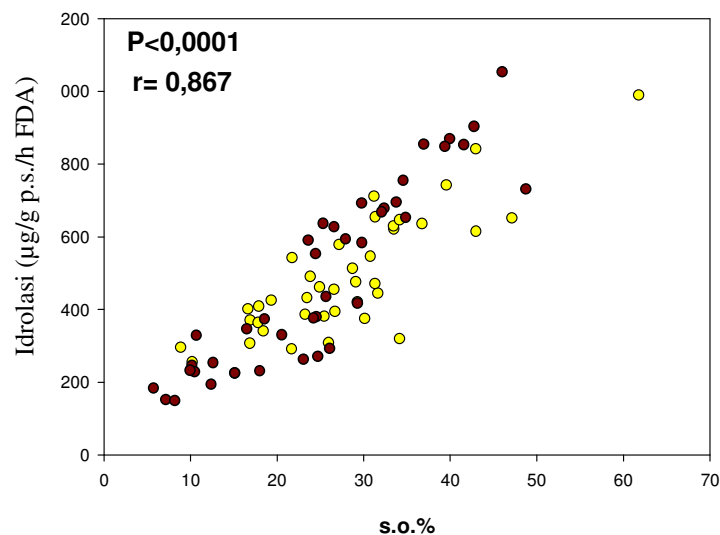


Figura 49: Correlazione tra il contenuto di sostanza organica ed attività idrolasica complessivamente per il campionamento primaverile e autunnale. In giallo sono rappresentati i siti campani, in rosso quelli toscani.

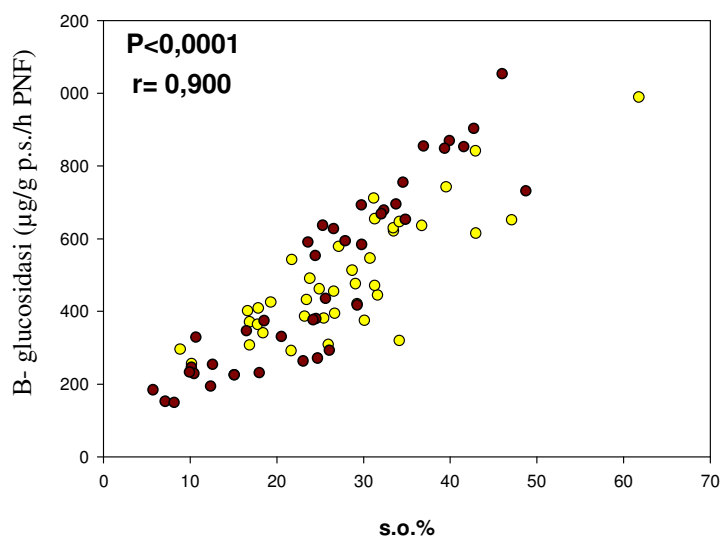


Figura 50: Correlazione tra il contenuto di sostanza organica ed attività β -glucosidasica complessivamente per il campionamento primaverile e autunnale. In giallo sono rappresentati i siti campani, in rosso quelli toscani.

Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi

L'analisi del profilo dei PLFA consente di ottenere informazioni sulle comunità microbiche e quindi, in questo studio è stata applicata allo scopo di indagare l'influenza di contaminanti quali metalli in traccia e IPA sulla struttura delle comunità microbiche dei suoli studiati. Le concentrazioni dei singoli acidi grassi estratti dai campioni di suolo delle aree di studio, espresse in moli %, sono state sottoposte ad analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (figura 51a) ha evidenziato lungo la prima componente principale una netta separazione tra le due regioni studiate, indicando la presenza di comunità microbiche diverse nella loro struttura. Poiché le aree studiate sono tutte caratterizzate da copertura a leccio, tale differenziazione nella struttura della comunità è da attribuire a fattori di diversa natura, ma è verosimile che le differenze climatiche e quelle di carattere pedogenetico abbiano avuto un ruolo predominante in questa separazione. I siti toscani rientrano inoltre, nella vasta zona a sud della regione definita delle colline metallifere (Bargagli et al., 2002).

Lungo la prima componente principale si osserva anche una separazione del sito periurbano campano (C4) dagli altri della stessa regione. Tale separazione è coerente col fatto che si tratta di un sito vulcanico, quindi con caratteristiche pedogenetiche distinte dagli altri siti della Campania. Una separazione tra aree di studio si osserva, per la Toscana, nella seconda componente principale. In particolare il sito remoto T5 si separa nettamente da tutti gli altri. Anche in questo caso è da considerare che si tratta di un sito localizzato in prossimità del mare e con un suolo prevalentemente sabbioso, quindi molto diverso dagli altri della Toscana; i siti T2 e T3 appaiono abbastanza omogenei tra loro e si separano dai siti T1 e T4 che sono più simili.

Osservando i loadings (figura 51b) è possibile avere una indicazione di quali acidi grassi sono più rappresentati in ciascuna regione. In particolare, è possibile verificare come gli acidi grassi 20:0, 18:0, 16:0, br18:0, 10Me16:0 e i17:0 risultino relativamente più abbondanti nei suoli campani, mentre gli acidi grassi 10Me18:0, cy19:0, 16:1 ω 7t, 19:1a, 18:1 ω 7, 17:0, 10Me17:0, cy17:0, 18:2 ω 6, br17:0, 20:4, 14:0, 18:1 ω 9, a17:0, 15:0, i14:0, 16:1 ω 5, 16:1 ω 9, 18:1, 17:1 ω 8, i15:0, i16:0, 16:1 ω 7c e a15:0 sono relativamente più abbondanti nei suoli toscani.

I risultati sembrano suggerire che nei suoli della Campania si siano selezionate comunità microbiche caratterizzate dalla prevalenza di alcuni gruppi più specializzati in quanto vi sono pochi acidi grassi che predominano nel profilo, mentre la maggior parte di essi risulta meno rappresentata. I suoli Toscani sembrerebbero invece avere comunità microbiche più diversificate. In questi ultimi risulta più rappresentato anche l'acido grasso 18:2 ω 6,9 indicatore della biomassa fungina. Tale risultato è coerente con quello precedentemente mostrato per l'ergosterolo (figura 45) e infatti i due parametri risultano significativamente correlati (figura 52).

più alta concentrazione di Ni. Analoghi risultati sono riportati (Bååth et al., 1992) per suoli contaminati in prevalenza da Fe e Al; gli stessi autori riportano in suoli contaminati anche una maggiore abbondanza dell'acido grasso 10Me:18, tipico degli attinomiceti. Inoltre, per siti contaminati generalmente è riportato un decremento del PLFA 15:0 (Bååth et al., 1992) e ciò è in accordo con la minore abbondanza di questo PLFA nei suoli campani; tuttavia gli stessi autori riportano una diminuzione di questo acido grasso, insieme al 10Me16:0, 16:17t e al cy19:0, col diminuire del pH. In alcuni studi (Pennanen et al., 1996; Ramsey et al., 2005), con l'aumentare dello stress dovuto alla presenza di metalli si è riscontrato un aumento dei batteri Gram + a spese di quelli Gram - e un incremento dei PLFA metilati (Kroppenstedt, 1985).

Gli studi in letteratura che valutano l'effetto della presenza di IPA sulla struttura delle comunità microbiche sono meno frequenti di quelli relativi ai metalli in traccia. Spesso in questi lavori si è cercato di capire come varia la struttura della comunità microbica a seguito di inoculi di funghi nel suolo, data l'importanza di questi ultimi nella degradazione di composti aromatici e quindi di valutare il loro possibile utilizzo in studi di bioremediation (Tomberg et al., 2003).

L'analisi del profilo dei PLFA è stata applicata anche alle sole aree dei transetti (Figura 53a,b), escludendo i siti periurbani e remoti che presentano caratteristiche ambientali molto diverse, per poter valutare gli effetti della deposizione di metalli in traccia e IPA sulle comunità microbiche senza interferenze dovute alla diversa tipologia dei suoli studiati. La prima componente principale evidenzia (figura 53a) una netta separazione tra le due regioni, in accordo con l'analisi precedentemente effettuata. La seconda componente principale evidenzia una marcata separazione tra i punti più vicini alla strada (C1) e (T1) rispetto a quelli più interni. Tale risultato conferma la presenza di fattori di disturbo in prossimità della strada, che influenzano la struttura della comunità microbica.

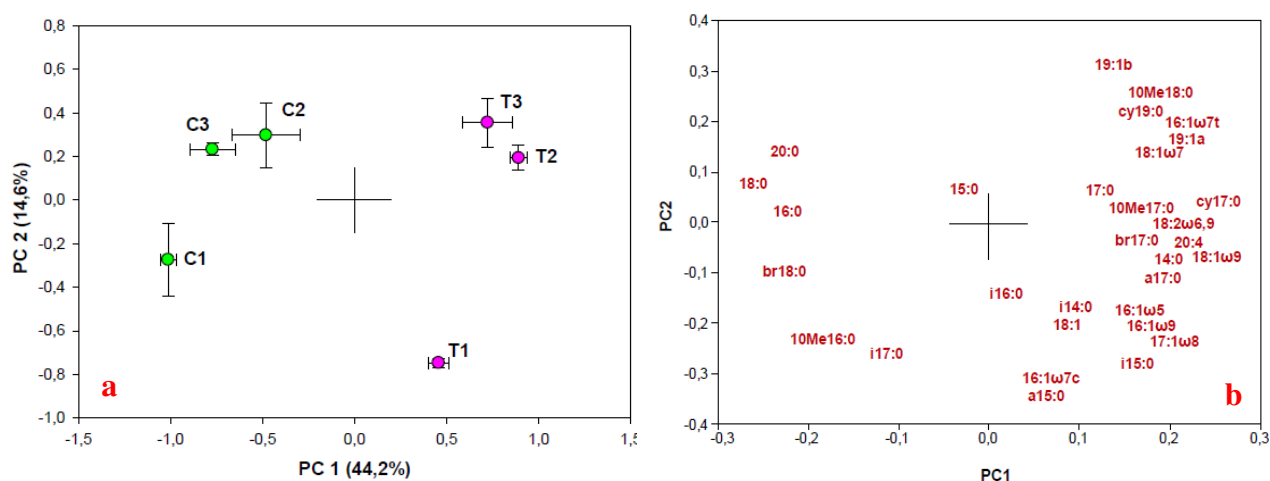


Figura 53: Analisi delle componenti principali del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA) dei suoli dei transetti urbani della Campania e della Toscana. a) scores della prima e della seconda componente principale; b) loadings della prima e della seconda componente principale.

Effettuando poi una PCA separatamente per i due transetti e correlando gli scores della prima componente principale (figura 54), è interessante notare che i suoli dei due transetti, sebbene caratterizzati da comunità microbiche strutturalmente diverse, variano in maniera simile con l'aumentare della distanza dalla strada.

Ancora una volta, non è possibile riconoscere nel traffico veicolare l'unico responsabile di tali andamenti, in quanto esso costituisce senza dubbio una fonte di disturbo ma non è certamente l'unico fattore che può contribuire a caratterizzare la struttura della comunità microbica.

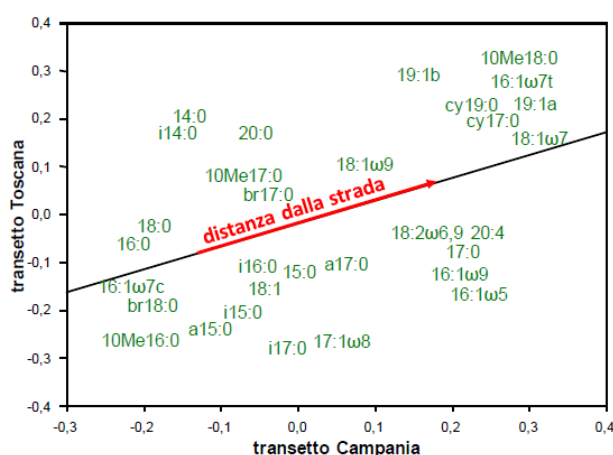


Figura 54: Correlazione loadings PC1 transetto Campania/PC1 transetto Toscana.

Pennanen e collaboratori (1996), studiando i suoli nelle vicinanze di due fonderie, hanno riscontrato un aumento dell'abbondanza dell'acido grasso br18:0 ed una diminuzione del 18:1w7 lungo un gradiente di concentrazione di rame che diminuisce all'aumentare della distanza dalle fonderie.

Questi andamenti sono in accordo con quelli riscontrati nei due transetti urbani in relazione alla distanza dalla strada.

Profilo di risposta catabolica

I profili di risposta catabolica sono rappresentati nelle figure (55, 56). Mediamente i profili osservati per le aree di studio consentono di ricavare una serie di tratti comuni soprattutto per i siti urbani. I punti del transetto più vicini alla strada (C1 e T1) rispetto agli altri punti (C2 e C3, T2 e T3), presentano le più alte risposte respiratorie indotte dagli acidi citrico, succinico, urocanico e malonico (che sono anche quelli che mostrano la maggiore variabilità stagionale, con valori più elevati in autunno) e più basse risposte per gli acidi α -chetobutirrico e α -chetoglutarico. I siti periurbani (C4 e T4) mostrano profili di risposta catabolica confrontabili con quelli dei transetti. Se il sito remoto campano (C5) mostra delle analogie nei profili con gli altri siti della regione, il sito remoto toscano (T5) presenta un profilo molto diverso dagli altri. In particolare, si caratterizza per le elevate risposte agli acidi α -chetobutirrico e α -chetoglutarico e la bassissima risposta all'acido urocanico, che nei suoli urbani era tra i composti che inducevano la più alta risposta respiratoria. Tale risultato indica, per Cala Violina, una comunità microbica funzionalmente distinta da quelle degli altri suoli toscani.

I profili osservati, sono nel complesso molto diversi da quelli riportati da Iovieno e collaboratori (2002) relativamente a leccete del Vesuvio e del bosco di San Silvestro. Ciò può indicare che le differenze osservate tra i suoli studiati possono essere attribuite a fattori diversi dalla copertura vegetale, tra i quali la presenza di inquinanti e le caratteristiche pedo-climatiche potrebbero essere solo alcuni tra i tanti.

Dal profilo di risposta respiratoria è stato calcolato (tabella 9) un indice di uniformità della risposta respiratoria, definito come catabolic evenness (CE). Avendo somministrato 25 diversi substrati, il valore massimo che la CE poteva assumere è pari a 25, che si avrebbe se tutti i substrati venissero utilizzati nella stessa misura.

Parco di Capodimonte			Astroni	Ottati	Villa Patrizia			Belcaro	Cala Violina
Campania					Toscana				
Primavera									
C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
9,5 ^a	17,3 ^b	17,7 ^b	16,4 ^b	16,0 ^b	9,7 ^A	12,6 ^{AB}	11,6 ^{AB}	9,6 ^A	14,7 ^B
Autunno									
C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
10,9 ^a	20,5 ^b	18,5 ^b	18,5 ^b	9,4 ^a	10,0 ^A	11,0 ^A	11,9 ^A	12,4 ^A	16,8 ^B

Tabella 9: Catabolic evenness per i siti della Campania e della Toscana in autunno e primavera. . Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

Le differenze osservate per i valori di CE non sono risultate significative tra i due campionamenti. Significative sono invece risultate le differenze tra regioni ($P < 0,001$), indicando valori mediamente più alti per la Campania. Il sito C1 campano mostra nei due campionamenti valori di CE significativamente ($P = 0,05$) più bassi (9,5 e 10,9 rispettivamente per il campionamento primaverile e autunnale) rispetto agli altri punti del transetto. Per il transetto toscano le differenze non sono risultate significative. Tra i siti campani, quello remoto (C5) presenta le maggiori differenze stagionali, con valori più bassi ($P = 0,05$) in autunno (9,4). Anche per i siti toscani è quello remoto (T5) che mostra le maggiori differenze rispetto alle aree della stessa regione, presentando i valori di CE più alti (mediamente 15,8). Questo dato è importante in quanto sebbene questo sito remoto abbia sempre mostrato valori bassi di biomassa microbica e fungina e di attività metaboliche della comunità microbica, è quello che presenta la maggiore diversificazione delle attività cataboliche, mostrando una elevata equiripartizione delle attività degradative nei confronti dei substrati somministrati.

Per i suoli del parco nazionale del Vesuvio, caratterizzati da copertura a leccio, Iovieno e collaboratori (2002) hanno riportato un valore di CE pari a 19,3. Questo risulta confrontabile con i valori di CE ottenuti per due dei punti del transetto (C2 e C3) e per il sito periurbano (C4) della Campania. Tra i siti toscani solo quello di Cala Violina (T5) presenta valori di CE confrontabili a quelli riportati per la lecceta vesuviana, mentre gli altri siti toscani presentano sempre valori più bassi.

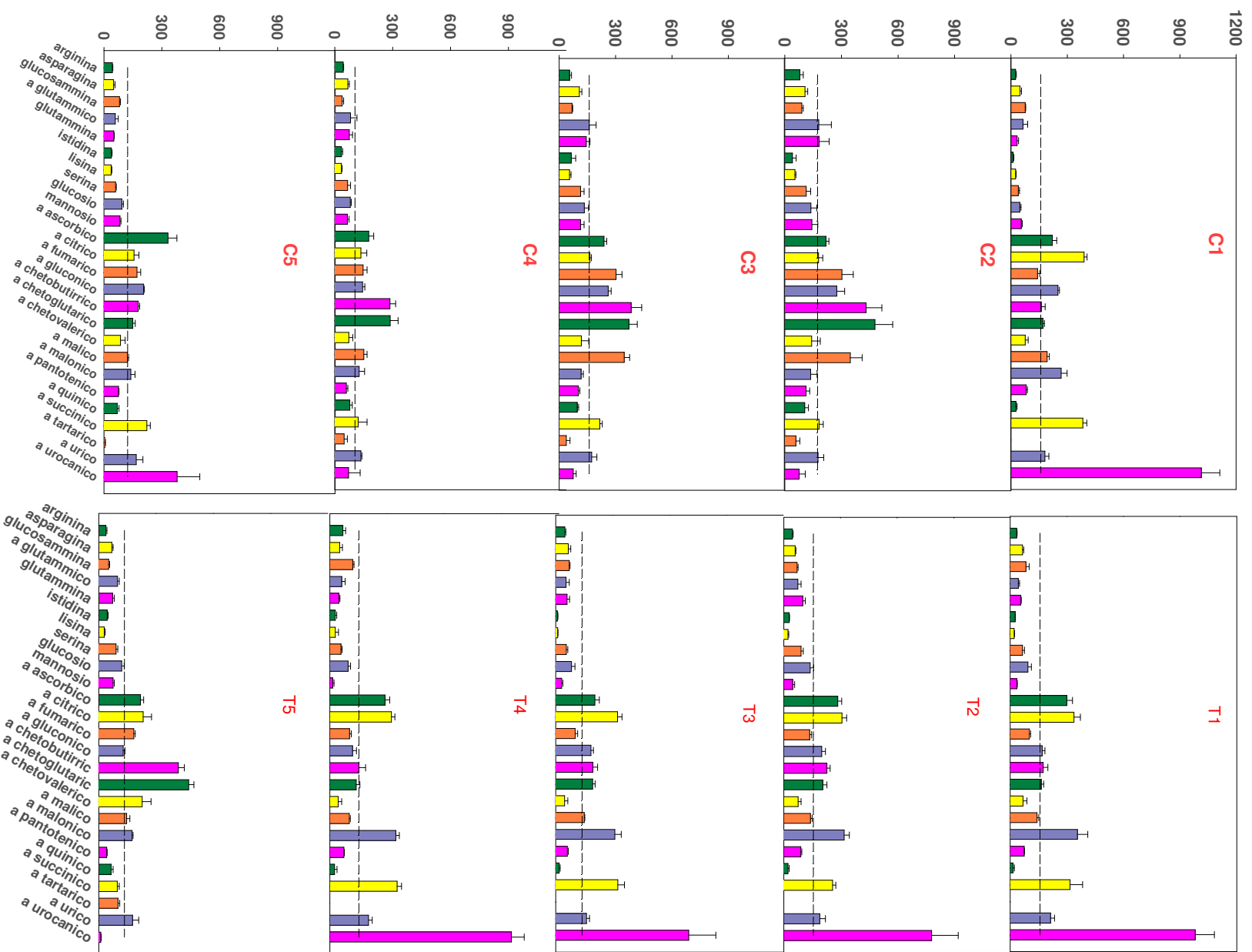


Figura 55: profili di risposta catabolica, per i siti della Campania e della Toscana, relativi al campionamento primaverile. La linea tratteggiata rappresenta l'incremento medio della respirazione indotto da tutti i substrati.

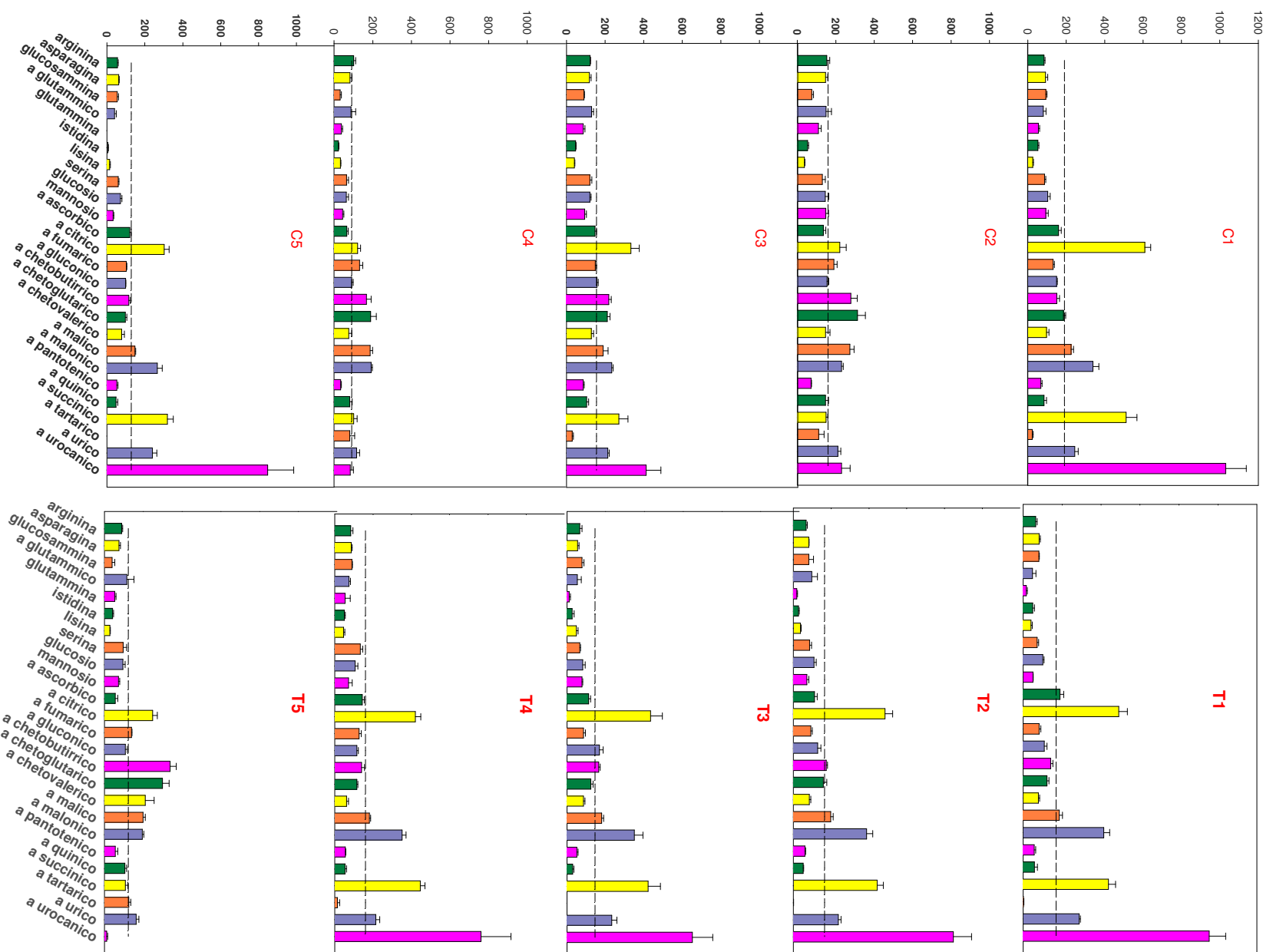


Figura 56: profili di risposta catabolica, per i siti della Campania e della Toscana, relativi al campionamento autunnale. La linea tratteggiata rappresenta l'incremento medio della respirazione indotto da tutti i substrati.

I valori di respirazione misurati nei bianchi utilizzati nel metodo Degens, ovvero nei subcampioni di suolo in cui non è stato aggiunto alcun substrato, posso essere considerati indicativi della respirazione basale del suolo. Le differenze di respirazione basale osservate tra i due campionamenti sono risultate significative ($P < 0,001$), con valori mediamente più alti per il campionamento primaverile. Nell'ambito di ciascun campionamento le differenze non sono risultate significative tra regioni (figura 57a,b). I trend osservati per le aree di studio riflettono quelli della biomassa microbica e fungina, nonché quello delle attività enzimatiche sebbene le differenze tra siti siano meno accentuate. Esse infatti risultano significative ($P = 0,05$) per il solo campionamento autunnale. Tra i siti campani è quello remoto che presenta la più alta respirazione ($16,5 \mu\text{g CO}_2/\text{g p.s./h.}$), tra quelli toscani è il sito periurbano ($19,9 \mu\text{g CO}_2/\text{g p.s./h.}$).

I dati della respirazione basale sono stati utilizzati anche per calcolare il quoziente metabolico ($q\text{CO}_2$). Questo indice è stato proposto per la prima volta da Anderson e Domsch (1985) e si ottiene dal rapporto tra il carbonio della CO_2 evoluta nell'unità di tempo ed il carbonio microbico. Sebbene non sempre i risultati siano di facile interpretazione, numerosi studi riportano elevati valori di quoziente metabolico in condizioni di stress o disturbo (Biederbeck et al., 1987; Wolters, 1991), giustificati dal fatto che le cellule microbiche, per fronteggiare lo stress e riparare i sistemi cellulari danneggiati, necessiterebbero di un surplus di energia, ottenuto incrementando i processi respiratori. Nei suoli oggetto di questo studio, differenze significative sono state evidenziate tra i due campionamenti e in particolare, il $q\text{CO}_2$ risulta mediamente più alto nel campionamento autunnale (figura 58). Non sono state evidenziate differenze significative tra le due regioni.

A far assumere il valore più alto al campionamento primaverile è senza dubbio il sito del transetto campano più vicino alla strada (C1) che presenta il più alto ($P = 0,05$) quoziente metabolico. Tale risultato sembra in accordo con studi che riportano un declino del $q\text{CO}_2$ lungo un gradiente decrescente di contaminazione (Ohtonen, 1994). Questo sito è infatti quello dove è stato ritrovato mediamente il più alto contenuto di Cu che potrebbe inibire le attività biologiche. In letteratura sono riportati anche casi di suoli da tempo contaminati da metalli, in cui il quoziente metabolico risultava confrontabile con quello di suoli non contaminati (Chander e Brookes, 1991). Per il campionamento autunnale questo trend non si ripete, ma anzi, i siti del transetto urbano presentano valori più bassi ($P = 0,05$) del sito periurbano e di quello remoto, riflettendo maggiormente i trend precedentemente osservati per la biomassa e le attività microbiche.

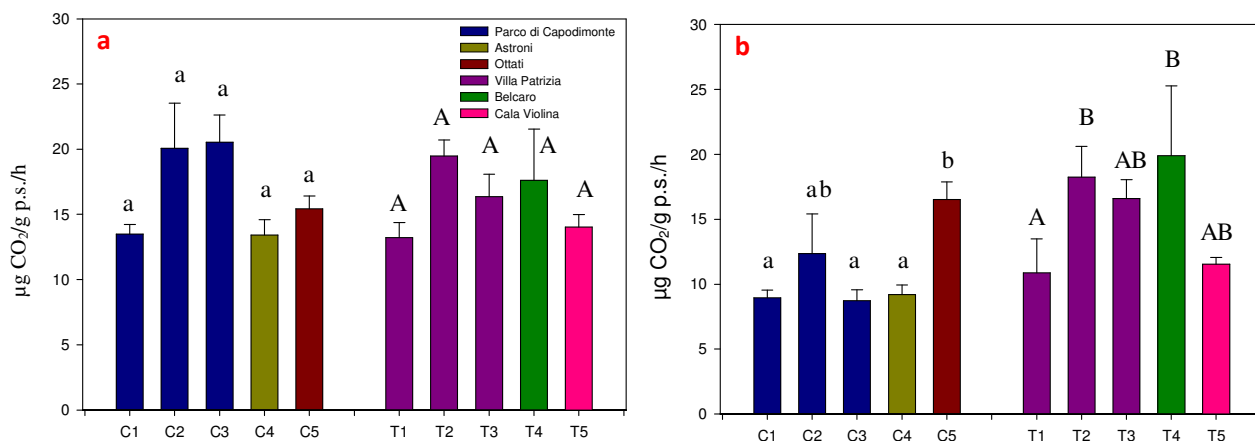


Figura 57: respirazione basale per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b). Per ciascuna area di campionamento è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

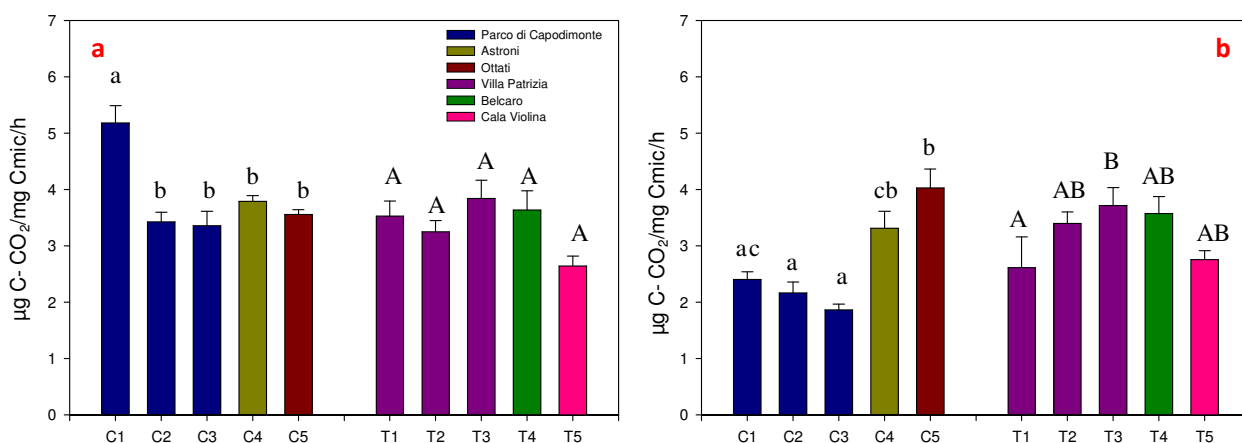


Figura 58: qCO_2 per il campionamento primaverile (a) e autunnale (b). Per ciascuna area di campionamento è riportata la media 4 sub-aree \pm e.s. Nei grafici è riportata la media delle 4 sub-aree \pm e.s. Le differenze significative ($\alpha = 0,05$) sono indicate separatamente per le due regioni con lettere diverse, minuscole per la Campania e maiuscole per la Toscana.

➤ Visione sinottica dei risultati

In tabella 10 sono riportati i valori di concentrazione degli elementi e degli IPA totali normalizzati rispetto al valore massimo di ciascun parametro, separatamente per Campania e Toscana. Risulta evidente che IPA, Fe, Zn, Cu, Pb e Cr presentano le più alte concentrazioni nei transetti urbani, sebbene non è sempre il sito più vicino alla strada quello che mostra la maggiore concentrazione. La vicinanza alla strada sembra influenzare maggiormente il transetto toscano, dove nel punto T1 si ha la maggiore abbondanza di Mg, Zn, Cu, Pb e IPA totali. Ni, Cd e Cr risultano più abbondanti nel sito remoto campano (C5) e il Mn nel transetto campano (C1, C2, C3) e nel sito remoto toscano (T5).

	Parco di Capodimonte			Astroni	Ottati	Villa Patrizia			Belcaro	Cala Violina
	Campania					Toscana				
	Primavera									
	C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
Na	1	1	1	0,98	0,80	0,98	1	1	0,93	1
K	0,94	0,90	0,91	0,81	1	0,95	0,95	1	0,97	0,99
Mg	1	0,89	0,90	0,52	0,68	1	0,90	0,96	0,73	0,56
Ca	0,62	0,62	0,48	1	0,76	0,73	0,70	0,60	1	0,13
Fe	0,93	1	0,91	0,75	0,59	0,65	0,79	1	0,59	0,47
Mn	0,95	1	0,94	0,60	0,58	0,46	0,54	0,57	0,41	1
Zn	1	0,90	0,99	0,54	0,40	1	0,63	0,57	0,71	0,26
Cu	1	0,15	0,25	0,09	0,13	1	0,40	0,33	0,45	0,09
Ni	0,74	0,62	0,64	0,29	1	0,63	0,70	1	0,62	0,76
Pb	0,53	0,68	1	0,19	0,10	1	0,88	0,55	0,23	0,18
Cd	0,59	0,44	0,43	0,16	1	0,99	0,87	1	1	0,91
Cr	0,74	0,72	1	0,37	0,98	0,64	0,72	1	0,61	0,74
IPA tot	0,26	0,17	1	0,06	0,03	1	0,30	0,20	0,70	0,11
	Autunno									
	C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
Na	0,64	0,67	0,74	1	0,20	0,64	0,87	0,87	0,45	1
K	0,50	1	0,66	0,86	0,38	0,73	0,80	0,86	0,81	1
Mg	0,77	0,47	1	0,46	0,96	1	0,70	0,75	0,69	0,54
Ca	1	0,24	0,29	0,72	0,17	0,90	0,16	0,04	1	0,06
Fe	0,80	1	0,73	0,79	0,54	0,64	0,79	1	0,58	0,57
Mn	0,84	0,97	1	0,77	0,61	0,56	0,69	0,65	0,41	1
Zn	0,83	0,63	1	0,43	0,31	1	0,58	0,50	0,42	0,28
Cu	1	0,37	0,27	0,08	0,11	1	0,32	0,27	0,25	0,04
Ni	0,76	0,74	0,57	0,22	1	0,71	0,73	1	0,57	0,76
Pb	0,89	0,36	1	0,71	0,16	0,56	1	0,95	0,29	0,20
Cd	0,52	0,38	0,42	0,14	1	1	0,71	0,81	0,97	0,43
Cr	0,46	0,52	0,52	0,26	1	0,61	0,86	1	0,54	0,81
IPA tot	0,31	0,25	1	0,08	0,05	1	0,48	0,60	0,43	0,23

Tabella 10: Concentrazione totale dei singoli elementi e di IPA nei suoli della Campania e della Toscana, normalizzate rispetto al valore massimo per ciascuna regione.

Dal momento che il contenuto totale di metalli nel suolo non equivale alla loro biodisponibilità (Tack e Verloo, 1995; Peijnenburg et al., 1997), la stessa normalizzazione è stata effettuata anche per la frazione disponibile (tabella 11) così da poter valutare quali elementi potessero maggiormente influenzare le attività della comunità microbica. In analogia col contenuto totale Fe, Zn, Cu, Pb, e Cr presentano mediamente la più alta disponibilità nei transetti urbani. A Cala Violina (T5) la contaminazione da Mn è confermata oltre che dalla più alta disponibilità di questo elemento, anche dalla concomitante abbondanza di Ni e Cr. La disponibilità di Ni e Cr nel sito remoto campano (C5) non riflette invece il contenuto totale di questi elementi, assumendo valori tra i più bassi.

	Parco di Capodimonte			Astroni	Ottati	Villa Patrizia			Belcaro	Cala Violina
	Campania					Toscana				
	Primavera									
	C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
Na disp	0,96	0,96	1	0,93	0,87	1	0,83	1	0,95	0,95
K disp	0,77	0,89	1	0,65	0,43	0,91	0,69	0,51	1	0,39
Mg disp	0,53	0,54	0,56	0,47	1	1	0,92	0,69	0,79	0,76
Ca disp	0,46	0,48	0,76	0,29	1	0,91	0,66	0,56	1	0,25
Fe disp	0,23	0,72	1	0,43	0,22	0,08	0,17	0,18	0,08	1
Mn disp	0,28	1	0,78	0,56	0,71	0,29	0,70	0,52	0,46	1
Zn disp	0,44	0,69	1	0,51	0,28	1	0,85	0,45	0,51	0,44
Cu disp	1	0,17	0,26	0,07	0,04	1	0,34	0,28	0,30	0,10
Ni disp	0,71	0,72	1	0,37	0,33	0,23	0,36	0,58	0,25	1
Pb disp	0,45	0,54	1	0,19	0,07	0,93	1	0,52	0,23	0,14
Cd disp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr disp	0,30	1	0,85	0,59	0,54	0,19	0,39	0,31	0,27	1
	Autunno									
	C1	C2	C3	C4	C5	T1	T2	T3	T4	T5
Na disp	0,79	0,88	1	0,43	0,39	1	0,82	0,76	0,87	0,80
K disp	0,68	0,94	1	0,47	0,28	0,80	0,61	0,49	1	0,27
Mg disp	0,86	0,72	0,84	0,45	1	1	0,81	0,72	0,85	0,52
Ca disp	1	0,58	0,57	0,61	0,97	1	0,50	0,83	0,84	0,32
Fe disp	0,31	0,55	0,29	1	0,19	0,08	0,15	0,28	0,08	1
Mn disp	0,38	0,55	0,48	1	0,40	0,30	0,44	0,35	0,44	1
Zn disp	0,94	0,53	1	0,90	0,21	1	0,68	0,40	0,41	0,26
Cu disp	1	0,08	0,24	0,43	0,01	1	0,42	0,22	0,33	0,06
Ni disp	1	0,22	0,74	0,76	0,20	0,25	0,28	0,25	0,12	1
Pb disp	1	0,31	0,96	0,77	0,10	1	0,99	0,85	0,15	0,11
Cd disp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr disp	0,11	0,17	0,36	1	0,27	0,12	0,21	0,19	0,12	1

Tabella11: Concentrazione della frazione disponibile di elementi nei suoli della Campania e della Toscana, normalizzata rispetto al valore massimo per ciascuna regione. Per il Cd la concentrazione era inferiore ai limiti di rilevabilità.

Per avere una visione complessiva dei risultati della ricerca e della possibile influenza delle deposizioni di inquinanti sulla comunità microbica, tutti i parametri determinati sul suolo, ad eccezione dei PLFA, sono stati elaborati insieme mediante l'analisi delle componenti principali. Per l'analisi si sono considerati i dati relativi ai due campionamenti. Il grafico degli scores (figura 59a) evidenzia lungo la prima componente principale una netta separazione tra il sito remoto toscano (T5) e tutti gli altri. La seconda componente principale evidenzia la separazione tra regioni. Fa eccezione il sito remoto campano (C5) che mostra caratteristiche più simili a quelle dei siti toscani, disponendosi tra le aree di questa regione. Non si osservano per i diversi siti differenze sostanziali tra i due campionamenti.

Il grafico relativo ai loadings (figura 59b) indica nella prima componente principale una netta separazione tra la frazione disponibile di Ni, Cr e Mn, e la concentrazione totale di Ni e Cr rispetto agli altri parametri determinati. Tale separazione indica un fenomeno di contaminazione a lunga distanza per Cala Violina. Nella seconda componente principale si separano prevalentemente parametri biologici e chimico-fisici da parametri legati alla contaminazione. Infatti nei quadranti relativi ai siti toscani risultano più abbondanti il contenuto di ergosterolo, carbonio microbico, respirazione, idrolasi, CIM, pH e sostanza organica. Nei quadranti relativi ai siti campani risultano più abbondanti concentrazione totale e frazione disponibile di Pb, Cu, Zn, Fe e IPA. La catabolic evenness ricade tra i siti campani, dove si ha una maggiore equipartizione nell'utilizzo dei substrati rispetto ai suoli toscani.

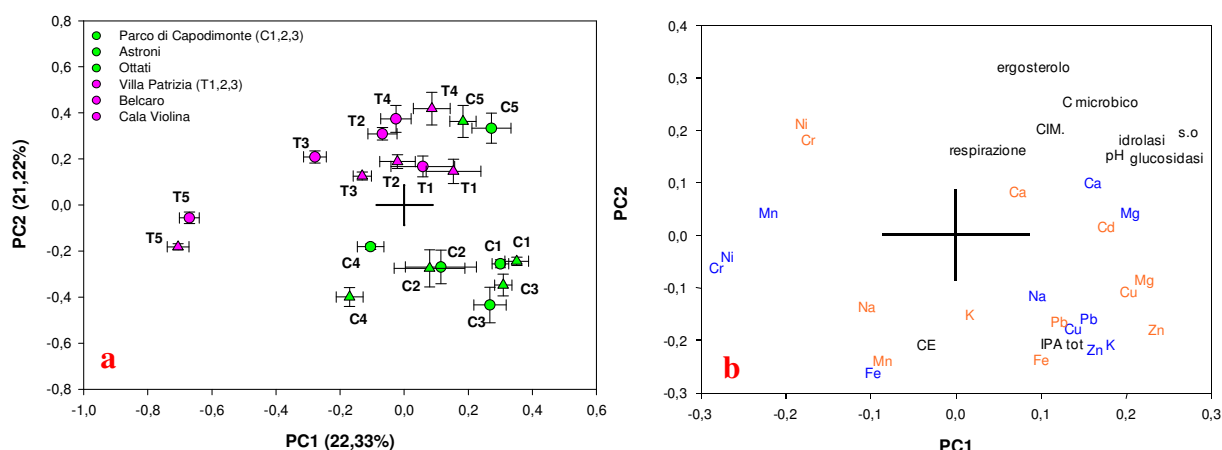


Figura 59: PCA dei suoli studiati nella quale sono stati inseriti i dati di concentrazione totale di elementi e IPA, della frazione disponibile degli elementi, i parametri chimico-fisici e i parametri biologici. Nel grafico a è riportata una media degli scores \pm e. s.; il grafico b mostra la distribuzione dei loadings. In a, i cerchi si riferiscono al prelievo primaverile, i triangoli a quello autunnale. In b, per gli elementi, l'arancio indica la concentrazione totale, il blu la frazione disponibile.

Infine, tutti i parametri biologici determinati ad eccezione della CE, risultano positivamente correlati (figura 60).

idrolasi	1					
β-glucosidasi	0,791	1				
C mic	0,684	0,677	1			
ergosterolo	0,633	0,626	0,779	1		
respirazione	0,322	0,355	0,384	0,480	1	
CE	n.s.	n.s.	-0,293	-0,441	n.s.	1
	idrolasi	β-glucosidasi	C mic	ergosterolo	respirazione	CE

P≤0,05

P≤0,01

P≤0,001

P≤0,0001

Figura 60: Matrice di correlazione tra i parametri biologici misurati

CONCLUSIONI

L'analisi elementare delle foglie di leccio di siti a diverso grado di impatto antropico ha evidenziato nelle aree campane e toscane studiate, ed in particolare nei transetti urbani, gradienti di contaminazione da elementi in traccia e idrocarburi policiclici aromatici emessi dal traffico veicolare.

I suoli delle aree studiate hanno mostrato una elevata variabilità dei parametri chimico-fisici e biologici misurati. I risultati indicano che molteplici fattori influenzano i trend osservati.

Uno dei parametri che senza dubbio ha influenzato in maniera predominante l'attività e la diversità delle comunità microbiche è il contenuto di sostanza organica del suolo. Si è osservata infatti una corrispondenza nei trend di questo parametro con la biomassa microbica e fungina e con le attività biologiche. Per un contenuto mediamente confrontabile di sostanza organica, i suoli toscani hanno però mostrato una più alta biomassa fungina. Quest'ultima, evidenziata dalla determinazione sia dell'ergosterolo, sterolo di membrana presente prevalentemente nei funghi, che dell'acido grasso 16:2 ω 6,9, tipico dei fosfolipidi dei funghi, potrebbe essere attribuita ad altri, importanti, fattori che diversificano le nostre aree di studio, quali il substrato pedogenetico e il clima.

Il più marcato effetto legato a caratteristiche pedologiche è stato osservato per il suolo sabbioso del sito remoto toscano, Cala Violina, che ha mostrato, per tutti i parametri biologici determinati, i valori più bassi. Questo suolo è comunque caratterizzato anche da una più elevata disponibilità di alcuni elementi in traccia, quali Mn, Ni e Cr, che possono determinare effetti negativi sullo sviluppo e l'attività dei microorganismi del suolo.

I parametri riconosciuti quali indici della struttura e dell'attività delle comunità microbiche del suolo hanno evidenziato, mediante PCA, una chiara separazione dei siti urbani più esposti alla contaminazione rispetto a tutti gli altri. Inoltre, l'analisi complessiva dei dati, mediante PCA, ha indicato una netta separazione fra le due regioni, attribuibile verosimilmente a fattori climatici e pedologici, nonché a una diversa entità di accumulo degli inquinanti.

Alle concentrazioni misurate nei suoli studiati, che comunque non sono risultate particolarmente elevate, gli inquinanti che sono stati monitorati non hanno mostrato effetti chiaramente evidenti. Sono risultati sicuramente più importanti altri fattori e fra questi sicuramente la sostanza organica che potrebbe comunque a sua volta mitigare o incrementare gli effetti delle specie chimiche inquinanti.

RINGRAZIAMENTI

Sembra ieri eppure sono trascorsi tre anni...Non dimenticherò mai il mio primo giorno a Fisciano, quando la Prof. Alfani mi disse "Ludo qui starai bene e avrai tante mamme che ti seguiranno..."

Al termine di questo percorso ringrazio di vero cuore lei, cara Prof., che mi ha sempre fatto sentire a casa, mi ha sempre incoraggiata e sostenuta.

Grazie alle Dott.sse Baldantoni, De Nicola e Iovieno che in questi anni mi hanno seguita come nessun altro avrebbe fatto e senza le quali non sarei mai riuscita a raggiungere questo traguardo. Mi auguro di non aver deluso le vostre aspettative!

Un dovuto ringraziamento va agli ingegneri Prati e Costagliola per la pazienza con la quale mi hanno seguito, e a tutti i colleghi dell'Università di Siena e Napoli che con me hanno lavorato sul progetto che ho seguito.

Non posso che ringraziare con sincero affetto:

- Alessandro Bellino per tutte le volte che gli ho chiesto aiuto;*
- Raffaella Morelli e tutti i tesisti che con me hanno lavorato al progetto, il loro aiuto è stato preziosissimo;*
- Giovanni Saviello per l'incoraggiamento degli ultimi giorni e per l'esempio di vita che mi ha dato;*
- tutti gli amici e colleghi degli altri laboratori (Angela, Daniela, Stefania...) che sono sempre stati dei punti di riferimento.*

Grazie alla mia famiglia che mi è stata vicino in questi anni e nell'ultimo periodo di stesura della tesi....

- grazie a te babbo che nonostante tutto la sera aspettavi che finissi di lavorare*
- grazie a te mamma per essermi stata vicino*
- grazie a te Imma, del tuo preziosissimo aiuto....vedremo se sarai altrettanto brava come testimone!!*
- grazie a te Sabatino...per avermi sempre incoraggiata a fare questa esperienza, per non esserti mai lamentato, per aver fatto ancora tre anni di sacrifici...*

BIBLIOGRAFIA

- Aamlid D., Tørseth K., Venn K., Stuanes A.O., Solberg S., Hylen G., Christophersen N., Flamstad, E. (2000).** Changes of Forest Health in Norwegian Boreal Forests during 15 Years. *Forest Ecology and Management*, 127:103–118.
- Abaye D.A., Lawlor K., Hirsch P.R., Brookes P.C. (2005).** Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. *European Journal of Soil Science*, 56: 93–102.
- Aber J.D., Nadelhoffer K.J., Steudler P., Melillo J.M. (1989).** Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience*, 39: 378–386.
- Acherar M., Rambal S., Lepart J. (1991).** Évolution du potentiel hydrique foliaire et de la conductance stomatique de quatre chênes méditerranéens lors d'un période de dessèchement. *Annals of Forest Science*, 48: 561–573.
- Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobianchi R., Violante P. (2003).** Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution*, 122: 91-103.
- Ajmal M., Ahmed A., Nomani A.A. (1982).** Microbial uptake of cadmium and its effects on biochemical oxygen demand. *Water Research*, 16:1611-4
- Ajmal M., Rafaqat A.K., Bilquees A.S. (1981).** Studies on removal and recovery of Cr(VI) from electroplating wastes. *Water Research*, 30:1478–82.
- Alfani A., Baldantoni D., Maisto G., Bartoli G., Virzo De Santo A. (2000).** Temporal and spatial variation in C, N, S and trace element contents in the leaves of *Quercus ilex* within the urban area of Naples. *Environmental Pollution*, 109:119-129
- Alfani A., Bartoli G., Virzo de Santo A., Lombardi M., Rutigliano F., Fioretto A., Gargiulo E. (1989).** Leaf elemental composition of *Quercus ilex* L. in the urban area of Naples. Trace elements. Conference Proceedings "Man and the Environment" Rome, 24 October.
- Alfani A., De Nicola F., Maisto G., Prati M. V. (2005).** Long-term PAH accumulation after bud break in *Quercus ilex* L. leaves in a polluted environment. *Atmospheric Environment*, 39: 307–314
- Allen S.E. (1989).** Chemical analysis of ecological materials. Second edition. S.E. Allen (ed.). Blackwell Scientific Publications.
- Alloway B.J. (1995).** Heavy metals in soil second edition. Blackie Academic & professional
- Alves L.C., Reis M.A., Freitas M.C. (1998a).** Air particulate matter characterisation of a natural area in Portugal. *Nuclear Instruments and Methods in Physical Research*, B136-138: 941–947
- Alves L.C., Reis M.A., Freitas M.C., Gouveia M.A. (1998b).** Elemental analysis of particulate matter and source identification in Lisbon. *X-Ray Spectrometry*, 27: 313–320.
- Anderson T.H. e Domsch K.H. (1993).** The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific metabolic parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the soil microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 393-395.
- Anderson T.H., Domsch K.H. (1985).** Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils*, 1:81-89
- Andrén O., Bengtsson J. and Clarholm M. (1995).** Biodiversity and species redundancy among litter decomposers. In *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*, ed. H. P. Collins, G. P. Robertson and M. J. Klug, pp. 141±151. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Avidano L., Gamalero E., Cossa G. P., Carraro E. (2005).** Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecology*, 30: 21–33

- Azuma M., Toyota Y.A., Kawano S. (1996).** Naphthalene a constituent of Magnolia flowers. *Phytochemical*, 42: 999–1004.
- Bååth E.(1989).** Effects of heavy metals in soil in microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution*, 47:335-379.
- Bååth E., 1998.** Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. *Microbial Ecology*, 36: 316-327.
- Bååth E., Frostegård Å., Fritze H. (1992).** Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 4026–4031.
- Bååth E., Frostegård Å., Pennanen T., Fritze H. (1995).** Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 229–240.
- Bååth E., Anderson T.H., (2003).** Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 955–963.
- Bååth E., Arnebrant, K. (1994).** Growth rate and response of bacterial communities to pH in limed and ash treated forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 995–1001.
- Baccouch S., Chaoui A., El Ferjani E.(1998).** Nickel toxicity : effects on growth and metabolism of maize. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 577–588.
- Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N., Perry R. (1991).** A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60: 79–300.
- Bakker M.I., Tolls J., Kollöfel C., (2001).** Deposition of atmospheric semivolatile compounds to vegetation. In: Lipnick, R.L., Hermens, J.L.M., Jones, K.C., Muir, D.C.G. (Eds.), *Persistent, Bioaccumulative and Toxic Chemicals I e Fate and Exposure*, ACS Symposium Series 772. American Chemical Society, Washington DC, pp. 218e236.
- Bakker M.I., Tolls J., Kollöffel, C. (2000).** Atmospheric deposition of SOC to plants. In: Lipnick, R.L., Hermens, J.L.M., Jones, K.C., Muir, D.C.G. (Eds.), *Persistent, Bioaccumulative and Toxic Chemicals I: Fate and Exposure*, American Chemical Symposium Series, pp. 218–236.
- Balsalobre C., Calonge J., Jiménez E., Lafuente R.,Mouriño M., Muñoz M. T., Riquelme M., Mas-Castella J. (1993).** Using the metabolic capacity of *Rhodobacter sphaeroides* to assess heavy metal toxicity. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 437-450.
- Bandick A.K., Dick R.P.(1999).** Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1471–1479.
- Barajas-Aceves M. (2005).** Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. *Bioresource Technology*, 96: 1405–1414.
- Barbero M., Loisel R., Quezèl P.(1992).** Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus Ilex* ecosystems. *Vegetatio*, 99-100: 19-34.
- Bargagli R., Brown D.H., Nelli L. (1999).** Metal biomonitoring with mosses: procedures for correcting for soil contamination. *Environmental Pollution*, 89: 169–175.
- Bargagli R., Cruscanti M., Leonzio C., Bacci E. (1998).** I bioindicatori In: Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*, UTET.
- Bargagli R., Monaci F., Borghini F., Bravi F., Agnorelli C. (2002).** Mosses and lichens as biomonitors of trace metals. A comparison study on *Hypnum cupressiforme* and *Parmelia caperata* in a former mining district in Italy. *Environmental Pollution*, 116: 279–287
- Bengtsson J. (1998).** Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 10:191-199

- Berdicevsky I., Duek L., Merzbach D. and Yannai S. (1993).** Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals. *Environmental Pollution*, 80:41-44.
- Berg B., Ekbohm G., Söderström B. E., Staaf H. (1991).** Reduction of decomposition rates of Scots pine needle litter due to heavy-metal pollution. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 165-178.
- Berg T., Steinnes E. (1997).** Recent trends in atmospheric deposition of trace elements in Norway as evident from the 1995 moss survey. *Science of the Total Environment*, 208:197–206.
- Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1996).** Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 292–295.
- Bidleman T. F. (1988).** Atmospheric processes. *Environmental Science and Technology* 22, 361-367
- Biederbeck V.O., Campbell C.A, Smith A.E. (1987).** Effect of long term 2,4-D field applications on soil biochemical processes. *Journal of environmental Quality*, 16: 257-262
- Binet S., Pfohl-Leszkowicz A., Brandt H., Lafontaine M., Castegnaro M.(2002).** Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin. *Science of the Total Environment* 300:37–49
- Bird N.R.A., Perrier E.M.A. (2003).** The pore-solid fractal model of soil density scaling. *European Journal of Soil Science*, 54:467-476.
- Blasco M., Domeño C., Nerín C.(2008).** Lichens biomonitoring as feasible methodology to assess air pollution in natural ecosystems: Combined study of quantitative PAHs analyses and lichen biodiversity in the Pyrenees Mountains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391:759–771
- Bloemen M.L., Markert B., Lieth H. (1995).** The distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoils of Osnabrück in relation to land use. *Science of the Total Environment*, 166: 137–148.
- Blum W.E.H (2006).** Soil Resources – The Basis of Human Society and the Environment. *Die Bodenkultur*, 57:4
- Bogan B.W., Lamar R.T. (1995).** One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2631–2635
- Bojes H.K., Pope P.G. (2007).** Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47:288–295.
- Bopp S.K., Lettieri T. (2007).** Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Gene*, 396: 293–302.
- Braam F., Klapwijk A. (1981).** Effect of copper on nitrification in activated sludge. *Water Research*, 15:1093–8.
- Bradley L.J.N., Magee B.H., Allen S.L. (1994).** *Journal of Soil Contamination*, 3:1.
- Bradley P. Degens, Louis A., Schipper L.A., Graham P. Sparling, Louise C. Duncan (2001).** Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1143-1153.
- Bregnard T., Hoehener P., Haener A., Zeyer J. (1996).** Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:299–307.
- Brohon B., Delolme C., Gourdon R. (2001).** Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 883– 891.
- Brookes P.C. (1995).** The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 269–279.

- Brookes P.C., McGrath S.P. (1984).** Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *Journal of Soil Science*, 35: 341–346.
- Broughton L.C. Gross K.L. (2000).** Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia*, 125:420-427.
- Brown D.H., Bates J.W. (1990).** Bryophytes and nutrient cycling. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 104: 129-147.
- Brown P. E., Mingos G. A. (1916).** The effect of some manganese salts on ammonification and nitrification. *Soil Science*, 1: 67-85.
- Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A. (1998).** Il suolo. *Ecologia generale*. UTET. Torino.
- Burns R.G. (1977).** Soil enzymology. *Sci. Prog.* 64, 275–285
- Burns R.G. (1982).** Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 423–427.
- Businelli M. complementi di chimica del suolo (2007).** Morlacchi editore (Perugia). Isbn: 978-88-6974-086-X
- Cadle S.H., Mulawa P.A., Ball J., Donase C., Weibel A., Sagebiel J.C., Knapp K.T., Snow R. (1997).** Particulate emission rates from in-use high-emitting vehicles recruited in Orange County, California. *Environmental Science and Technology*, 31: 3405±3412.
- Calamari D., Bacci E., Focardi S., Gaggi C., Morosini M., Vighi M., (1991).** Role of plant biomass in the global environmental partitioning of chlorinated hydrocarbons. *Environmental and Science Technology*, 25: 1489–1495.
- Casida L. E. Jr (1971).** Microorganisms in unamended soil as observed by various forms of microscopy and staining. *Applied Microbiology*, 21: 1040-1045.
- Cerniglia C.E. (1984).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, 30: 31–71.
- Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351–368.
- Cerniglia C.E. (1997).** Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 324–333
- Cerniglia C.E., Heitkamp M.A. (1989).** Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In: Varanasi U (Ed) *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment* (pp 41–68). CRC Press, Boca Raton, FL
- Chan Y. C., Simpson R. W., McTains G. H., Volwles P. D., Cohen D. D., Bailey G. M. (1997).** Characterisation of chemical species in PM_{2.5} and PM₁₀ aerosols in Brisbane, Australia. *Atmospheric Environment*, 31: 3773-3785.
- Chander K., Joergensen R.G. (2001).** Decomposition of ¹⁴C glucose in two soils with different amounts of heavy metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1811–1816.
- Chander K., Brookes P.c. (1991).** Microbial biomass dynamics during the decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non contaminated soils. *Soil biology and Biochemistry*, 23:917-925
- Chander K., Klein T., Eberhardt U., Joergensen R.G. (2002).** Decomposition of carbon-14-labelled wheat straw in repeatedly fumigated and non-fumigated soils with different levels of heavy metal contamination. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 86–91
- Chaudri A.M., McGrath S.P., Gibbs P., Chambers B.C., Carlton-Smith C., Bacon J., Campbell C., Aitken A. (2008).** Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1670–1680.

- Checkai R. T., Corey R. B., Helmke P. A. (1987).** Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil*, 99: 335-345.
- Chen T.B., Wong J.W.C., Zhou H.Y., Wong M.H. (1997).** Assessment of trace metal distribution and contamination in surface soils of Hong Kong. *Environmental Pollution*, 96: 61-68.
- Chen X., Tang J. J., Fang Z. G., Hu S. (2002).** Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soils of 19 weeds in southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science*, 3: 355-361.
- Chen X., Tang J. J., Fang Z. G., Shimizu K. (2004).** Effects of weed communities with various species numbers on soil features in a subtropical orchard ecosystem. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 102: 377-388.
- Claus H., Filip Z. (1997).** The evidence for a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiological Research*, 152, 209-216.
- Coates J.D., Anderson R.T., Woodward J.C., Phillips E.J.P., Lovley D.R. (1996).** Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science and Technology*, 3: 2784-2789.
- Cole D.W. (1992).** Nitrogen Chemistry, Deposition and Cycling in Forests. In: Jonhson D.W. Lindbergh S.E. (eds) *Atmospheric Deposition and Forest Nutrient Cycling*, *Ecol. Studies* 91: 150-213.
- Cole J.A., Bittner J.D., Longwell J.P., Howard J.B. (1984).** *Combust. Flame*, 56: 51.
- Coleman D.C., Crossley D.A. (1996).** *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic Press, London.
- Collins P.J., Kotterman M.J.J., Field J.A., Dobson A.D.W. (1996).** Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4563-4567.
- Convenzione di Stoccolma (2006).** Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* 209/3
- Coppola S., Dumontet S., Portonio M., Basile G., Marino P. (1988).** Effect of cadmium bearing sewage sludge on crop plants and microorganisms in two different soils', *Agriculture Ecosystems and Environment*, 20: 181-194.
- Coughtrey P. J., Jones C. H., Martin M. H., Shales S.W. (1979).** Litter accumulation in woodlands contaminated by Pb, Zn, Cd and Cu. *Oecologia*, 39: 51-60.
- Cremonesi P., Cavalieri E.L., Rogan E.G. (1989).** One-electron oxidation of 6-substituted benzo[a]pyrenes by manganic acetate. A model for metabolic activation. *The Journal of Organic Chemistry*, 54: 3561-3570.
- Criquet S., Joner E., Leglise P., Leyval C. (2000).** Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology Letters*, 22: 1733-1737.
- Crounse R.G., Pories W.J., Bray Jt., Mauger R.L. (1983).** Geochemistry and man: heal and disease; 1. essential elements, 2. Elements possibly essential, those toxic and others. In: I. Thornton, Ed., *Applied environmental geochemistry*, Academic Press, London, pp. 267-308; 309-333.
- D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quarantino D., Mincione E., Petruccioli M. (2005).** Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering*, 90: 723-731.
- Dalal R.C. (1998).** Soil microbial biomass what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 649-665
- Danish S., Madany I.M. (1992).** Concentrations of nitrogen dioxide throughout the state of Bahrain. *Environmental Pollution*, 77: 71-78.
- De Lillis M., Fontanella. A (1992).** Comparative phenology and growth in different species of the Mediterranean maquis of central Italy. *Vegetatio* 99-100: 83-96.

- de Miguel E., Llamas J.F., Chacón E., Berg T., Larssen S., Røyset O., Vadset M. (1997).** Origin and patterns of distribution of trace elements in street dust: unleaded petrol and urban lead. *Atmospheric Environment*, 31:(17)2733-2740.
- De Nicola F., Alfani A., D'Ambrosio N. (2011a).** Impact of the Mediterranean Urban Environment on Photosynthetic Efficiency of *Quercus ilex* Leaves. *Water Air and Soil Pollution*, 220:151–160.
- De Nicola F., Lancellotti C., Prati M.V., Maisto G., Alfani A. (2011b)** Biomonitoring of PAHs by using *Quercus ilex* leaves: Source diagnostic and toxicity assessment *Atmospheric Environment*, 45:1428-1433
- De Nicola F., Maisto G., Alfani A. (2003).** Assessment of nutritional status and trace element contamination of holm oak woodlands through analyses of leaves and surrounding soils. *The Science of the Total Environment*, 311:191–203
- De Nicola F., Maisto G., M.V. Prati , Alfani A.(2008).** Leaf accumulation of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Quercus ilex* L. *Environmental Pollution*, 153:376-383
- De Nicola F., Maisto G., Prati M.V., Alfani A.(2005).** Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. *Chemosphere*, 61: 432–440
- De Vivo B., Lima A, Siegel F.R. (2004).** *Geochimica ambientale metalli potenzialmente tossico*. Liguori editore
- DM 471/99.** Decreto Ministeriale n° 471 del 25/10/1999. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni. *Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario* n° 293 del 15/12/1999
- Degens B.P., 1998 Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 30, No. 14, pp. 1989-2000
- Degens B.P., Harris J.A.. (1997).** Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 29, Num.9/10, pp. 1309-1320
- Degens B.P., Schipper L. A., Sparling G.P., Vukovic M. V.(2000).** Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 189-196
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Duncan L.C. (2001).** Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1143-1153
- Deninson R., Caldwell B., Bormann B., Eldred L., Swanberg C., Anderson S. (1977).** The effects of acid rain on nitrogen fixation in western Washington coniferous forest. *Water, Air and Soil Pollution*, 8: 21-34
- Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R. (2001).** Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 919–927.
- Diamond M.L., Gingrich S.E., Fertuck K., Mc Carry B.E., Stern G.A., Billeck B., Grift b., Broker D., Yager T.D. (2003).** Evidence for organic film on an impervious urban surface: characterization and potential teratogenic effects. *Environmental Science and Technology* 34, 2900-2908.
- Dick R.P., Breakwell D.P., Turco R.F. (1996).** Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators, *Methods for Assessing Soil Quality*, vol. 9. Soil Science Society of America, Madison, WI pp. 9–17.
- Direttiva 1999/31/CE** del Consiglio, del 26 aprile 1999, relativa alle discariche di rifiuti *Gazzetta ufficiale* n. L 182 del 16/07/1999
- Dockery D.W., Pope III. A.C., Xu X., Spengler J.D., Ware J.H., Fay M.E., Ferris Jr. B.G., Speizer F.E. (1993).** An association between air pollution and mortality in six US cities. *The New England journal of Medicine*, 329:1753–1759.

- Domsch K. H., Beck Th., Anderson J. P. E., Sørensen B., Parkinson D., Trolldenier G. (1979).** A comparison of methods for soil microbial populations and biomass studies. *Seitschrift für Planzenernaehrung Bodenkunde* 142: 552-553
- Doran J. W., Parkin T.B (1996).** Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. *Methods for assessing soil quality. Soil Science Society of America Special Publication*, vol. 49.
- Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F., Stewart B.A. (1994).** Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. *Soil Science Society of America Special Publication No. 35. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI.*
- Doran J.W., Jones A.J. (1996).** Methods for assessing soil quality. *Soil Science Society of America Special Publication*, vol. 49. *Soil Science Society of America, Madison, WI.* 410 pp.
- Doran J.W., Parkin T.B. (1994).** Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W. (Ed.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Soil Science Society of America Special Publication No. 35. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI*, pp. 3 – 21
- Duffus J.H. (2002).** “Heavy metals”- A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74:793–807.
- Dyke P.H., Foan C., Fiedler H. (2003).** PCB and PAH releases from power stations and waste incineration processes in the UK. *Chemosphere*, 50:469–480
- Edwards, N. T., (1983).** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment: a review. *Journal of the Environmental Quality*, 12, 427-441.
- Eibes G., Cajthaml T., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2006).** Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere*, 64: 408–414.
- Ellert B. H, Bettany J. R. (1995).** Calculation of organic matter and nutrients stored in soils under contrasting management regimes. *Canadian Journal of Soil Science*, 75: 529-538.
- Elliott L. F. and Lynch J. M. (1994).** Biodiversity and soil resilience. In *Soil Resilience and Sustainable Land Use*, ed. D. J. Greenland and I. Szabolcs, pp. 353±364. *CAB International, London.*
- Englert, N. (2004).** Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicol. Lett.* 149, 235–242.
- EU (2001).** European Commission . Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle Regioni. *Ambiente 2010: il nostro futuro, la nostra scelta. Sesto programma di azione per l'ambiente. COM 2001/31, Buxelles.*
- EU (2002)a.** European Commission . Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle Regioni. *Verso una strategia tematica per la protezione del suolo. COM 179/2002, Buxelles.*
- EU (2002)b.** European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf).
- EU (2006).** European Commission . Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European economic and social Committee and the Committee of the Regions. *Thematic Strategy for Soil Protection. COM 2006/231, Buxelles.*
- EU (1998).** Direttiva 98/70/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alla qualità della benzina e del combustibile diesel e recante modificazione della direttiva 93/12/CEE del Consiglio, pubblicata su: *GU L 350 del 28.12.1998*, pagg. 58–68.
- European Communities (1996).** Council Directive 96 62 EC of 27 September 1996 on ambient air quality assessment and management. *Official Journal of European Communities No. L 296 of 21/11/1996.*

- Faegri A., Torsvik V. L., Goksöyr J. (1977).** Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 105-112.
- Fergusson J.E. (1990).** The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press, Oxford, England, 615 pp.
- Fernández J.A., Ederra A., Carballeira A. (1997).** Biocontrol of the atmospheric deposition of heavy metals in Navarra (Spain) by terrestrial mosses. *Munibe*, 49: 101-109 (in Spanish).
- Figueira R., Sérgio C., Sousa A.J. (2002).** Distribution of trace metals in moss biomonitors and assessment of contamination sources in Portugal. *Environmental Pollution*, 118: 153-163.
- Florenzano G. (1989).** Fondamenti di microbiologia del terreno. REDA, Roma.
- Franzluebbers A.J., Haney R.L., Hons F.M. (1999).** Relationships of chloroform fumigation-incubation to soil organic matter pools. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 395-405.
- Freedman B., Hutchinson T.C. (1978).** Smelter Pollution Near Sudbary, Ontario, Canada and Effects on Forest Litter Decomposition. In *Effects of Acid Precipitation on Terrestrial Ecosystems* Scarborough: NATO Advanced Research Institute, pp. 395-434.
- Freitas M.C., Reis M.A., Marques A.P., Wolterbeek H.Th. (2000).** Dispersion of chemical elements in an industrial environment studied by biomonitoring using *Parmelia sulcata*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 244: 109-113.
- Fritze H., Vanhala P., Pietikäinen J., Mälkönen E. (1996).** Vitality fertilization of Scots pine stands growing along a gradient of heavy metal pollution: short-term effects on microbial biomass and respiration rate of the humus layer. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 354: 750-755.
- Frostegård Å., Bååth E. (1996).** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Frostegård Å., Bååth E., Tunlid A. (1993).** Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 723-730.
- Gadd G.M. (1993).** Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124:25-60.
- Gadd, G. (1992).** Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*, 100: 197-204.
- Galarneau E. (2008).** Source specificity and atmospheric processing of airborne PAHs: Implications for source apportionment. *Atmospheric Environment* 42: 8139-8149.
- Gaspari L., Chang S.S., Santella R.M., Garte S., Pedotti P., Taioli E., (2003).** Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as marker of DNA damage and infertility. *Mutation Research* 535, 155-160.
- Gebauer G., Giesemann A., Schulze E.-D., Jäger, H.-J., (1994).** Isotope ratios and concentrations of sulphur and nitrogen in needles and soils of *Picea abies* stands as influenced by atmospheric deposition of sulphur and nitrogen compounds. *Plant and Soil*, 164, 267-281.
- Gerdola R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrina P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S. (2002).** Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment*, 36:4069-4075
- Gianfreda L., Rao M. A. (2004).** Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 339-354
- Gierer J., Yang E., Reitberger T. (1992).** The reaction of hydroxyl radicals with aromatic rings in lignin, studied with cresol and 4-methylveratrol. *Holzforschung*, 46: 495-504
- Giller K. E., Witter E., McGrath S.P. (2009).** Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:2031-2037

- Giller K. E., Beare M. H., Lavelle P., Izac A. M. N., Swift M. J. (1997).** Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6:3-17.
- Gilli G., Traversi D., Rovere R., Pignata C., Schilirò T. (2007).** Airborne particulate matter: Ionic species role in different Italian sites. *Environmental Research*, 103: 1–8
- Gillian A., Harry D. (2001).** Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:943-951
- Giordano S., Adamo P., Sorbo S., Vingiani S. (2005).** Atmospheric trace metal pollution in the Naples urban area based on results from moss and lichen bags *Environmental Pollution*, 136 :431e442
- Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R. (1993).** Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108, 205–210.
- Goldberg L., Zaccheo F. (2003).** Inquinamento del suolo. In Provini A., Galassi S., marchetti R. (2003). *Ecologia applicata*. Città studi edizioni.
- Goldberg, L.F., Farini, A. (1994).** Complesso di scambio. In: *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo*. Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali, Roma, pp. 139-154.
- Goldman R., Enewold L., Pellizzari E., Beach JB. (2001).** Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer research AACR*, 61: 6367–6371
- Gramss G., Voigt K-D, Kirsche B. (1999).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils *Biodegradation*, 10: 51–62, 1999.
- Grant W.D. e West A.W., (1986).** Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: Evaluation as indicators of microbial biomass. *Journal of microbiological methods* 6: 47-53.
- Gratani L. (1996).** Leaf and shoot growth dynamics of *Quercus ilex* L. *Acta Oecologica*, 17: 17–27.
- Gratani L., Crescente M.F., Petruzzi M. (2000).** Relationship between leaf life-span and photosynthetic activity of *Quercus ilex* in polluted urban areas (Rome). *Environmental Pollution*, 110: 19-28.
- Gray T.R.G. (1990).** Methods for studying the microbial ecology of soil. In: R. Grogovia and J. R. Norris (Editori), *Methods in Microbiology*, Vol. 22. Academic Press, London, pp.309-342.
- GreenV.S., Stott D.E., Diack M. (2006).** Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 693–701
- Gregger M. (1999).** Metal availability and bioconcentration in plants. In: *Heavy metal stress in plants from molecules to ecosystems* (eds: M.N.V. Prasad, J. Hagemeyer), Springer, Berlin, New York: pp. 1-27.
- Gridin V.V., Litani-Barzilai I., Kadosh M., Schechter I. (1997).** *Analytical Chemistry*, 69: 2098.
- Grob K., Biedermann M., Carmaschi A., Pacciareli B. (1991).** *Journal of High Resolution Chromatography*, 14:33.
- Gundersen P. (1992).** Mass balance approaches for establishing critical loads for nitrogen in terrestrial ecosystems. In: P.Grennfelt Thörnelöf E. (eds) *Critical Loads for Nitrogen*, a Workshop Report. pp. 55–110
- Hackl E., Pfeffer M., Donat C., Bachmann G., Zechmeister-Boltenstern S. (2005).** Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 661–671.
- Ham J. (1992).** Discussion about the national model for dispersion of air pollution. *Lucht*, 9: 84–85
- Harley J.L. (1971).** Fungi in ecosystems. *Journal of ecology*, 59: 653-668

- Harner T., Bidleman T.F. (1998).** Octanol air partition coefficient for describing particle/gas partitioning of aromatic compounds in urban air. *Environmental Science and Technology*, 32: 1494-1502.
- Hell R., Stephan U. W. (2003).** Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216:541–51.
- Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S. (1977).** Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33:1225-1228.
- Högberg M.N., Högberg P., Myrold D.D. (2007).** Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C- to N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 150: 590–601.
- Högberg M.N., Bååth E., Nordgren A., Arnebrant K., Högberg P. (2003).** Contrasting effects of nitrogen availability on plant carbon supply to mycorrhizal fungi and saprotrophs: a hypothesis based on field observations in boreal forest. *New Phytologist*, 160: 225–238.
- Hopkins T.L., Kramer K.J. (1992).** Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology*, 37: 273–302.
- Horstmann M., McLachlan M.S. (1998).** Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to two forest canopies. *Atmospheric Environment*, 32: 1799e1809
- Howsam M., Jones K.C., Ineson P. (2000).** PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I: concentrations and profiles. *Environmental Pollution*, 108:413–424.
- Howsam M., Jones K.C., Ineson P. (2001).** PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season. *Chemosphere*, 44:155–164.
- Hyun-Min H., Terry L. W., Jose L. S. (2003).** Concentrations and source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles from Korea, Mexico, and United States. *Atmospheric Environment*, 37:2259–2267.
- IARC (1987).** International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
- IARC (2011).** International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans
- Ingham R.E., Trofymow J.A., Ingham E.R. e Coleman D.C. (1985).** Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs*, 55:119–140.
- Iovieno P., Alfani A. (2002).** Influence of Pinus pinea plantation on physico-chemical and biological soil proprieties in Quercus ilex climax area in Campania (Southern Italy)
- Iovieno P., Alfani A., Bååth E. (2010).** Soil microbial community structure and biomass as affected by Pinus pinea plantation in two Mediterranean areas. *Applied Soil Ecology*, 45: 56-63.
- Izza C., Canepa D., Maggiolo R., (1994).** Microelementi ‘assimilabili’. In: Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali. Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo, p. 175-184.
- Jalkanen L., Mäkinen A., Hasanen E., Juhanoja J. (2000).** The effect of large anthropogenic particulate emissions on atmospheric aerosols, deposition and bioindicators in the eastern Gulf of Finland region. *The Science of the Total Environment*, 262: 123-136.
- Jenkinson D. S., Oades J. M. (1979).** A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 11:193-199.
- Jenkinson D.S., Ladd J.N. (1981).** Microbial biomass in soil: measurement and turnover, in Paul E.A., Ladd J.N.: *Soil Biochemistry*, volume 5. Dekker, New York PP 415-471.
- Joergensen R.G., (1996).** The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the *K_{ec}* value. *Soil biology and biochemistry* 8: 167-177.

- Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H. (2005).** Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71–84.
- Johnson K.H., Vogt K.A., Clark H.J., Schmitz O.J., Vogt D.J. (1996).** Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 372–377.
- Jones C.G., Lawton J.H. (Eds.) (1995).** *Linking Species and Ecosystems*. Chapman and Hall, London. 387 pp.
- Jones K.C., Grimmer G., Jacob J., Johnston A.E., (1989).** Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of wheat grain and pasture grassland over the last century from one site in the UK. *Science of the Total Environment*, 78: 117–130.
- Jussy J. H., Colin – Belgrand M., Dambrine É., Ranger J., Zeller B., Bienaimé S. (2004).** N deposition, N transformation and N leaching in acid forest soils. *Biogeochemistry*, 69: 241–262.
- Karin Tornberg, Erland Bååth, Stefan Olsson, (2003).** Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils *Biology and Fertility of Soils* (2003) 37:190–197
- Karlen D. L., Ditzler C.A., Andrews S. S. (2003).** Soil quality: why and how?. *Geoderma*, 114:145–156.
- Karlen D. L., Mausbach M. J., Doran J. W., Cline R. G., Harris R. F., Schuman G. E. (1997).** Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61:4–10.
- Katsouyanni K., Touloumi G., Samoli E., Gryparis A., Le Tertre A., Monopoli Y., Rossi G., Zmirou D., Ballester F., Boumghar A., Anderson H.R., Wojtyniak B., Paldy A., Braunstein R., Pekkanen J., Schindler C., Schwartz J. (2001).** Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology*, 12:5, 521–531.
- Kelly, J.J., Häggblom M., Tate III R.L.(1999).** Changes in soil microbial community over time resulting from one time applications of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1455–1465.
- Killam K. (1994).** *Soil ecology*. Cambridge University press
- Kipopoulou A.M, Manoli E., Samara C. (1999).** Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*, 106:369–380
- Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach (2003).** Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soil exposed and unexposed PAHs. *Water, Air, and Soil Pollution* 145: 169–186, 2003.
- Kłos A., Rajfur M., Waclawek M., Waclawek W. (2007).** Heavy metal sorption in the lichen cationactive layer. *Bioelectrochemistry*, 71: 60–65.
- Knight T. R., Dick R. P. (2004).** Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 2089–2096
- Kömp P., McLachlan M.S. (1997).** Interspecies variability of the plant/air partitioning of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology*, 31: 2944–2948.
- Koptsik S., Koptsik G., Livantsova S., Eruslankina L., Zhmelkova, T., Vologdina Z. (2003).** Heavy Metals in Soils Near the Nickel Smelter: Chemistry, Spatial Variation, and Impacts on Plant Diversity. *Journal of Environmental Monitoring*, 5:441–540.
- Kowalczyk G.S., Gordon G.E., Rheingrover S.W. (1982).** Identification of atmospheric particulate sources in Washington, D.C. using chemical element balances. *Environmental Science and Technology*, 16: 79–90.
- Kramer K.J., Kanost M.R., Hopkins T.L., Jing H., Zhu Y.C., Xu R., Kerwin J.L., Turecek F. (2001).** Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57: 385– 392

- Krauss M., Wilcke W. And Zech W. (2000).** Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenols in forest soils: depth distribution as indicator of different fate. *Environmental Pollution*, 110: 79-88.
- Krauss M., Wilcke W., Martius M., Bandeira A. G., Garcia M. V. B., Amelung W. (2005).** Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental Pollution*, 135, 143-154.
- Krewski D., Burnett R.T., Goldberg M.S., Hoover B.K., Siemiatycki J., Jerrett M., Abrahamowicz M., White W.H. (2003).** Overview of the reanalysis of the Harvard six cities study and American cancer society study of particulate air pollution and mortality. *Journal of Toxicology Environmental Health A* 66, 1507–1551.
- Krewski D., Burnett R.T., Goldberg M.S., Hoover K., Siemiatycki J., Abrahamowicz M., White W.H. (2004).** Validation of the Harvard Six Cities Study of particulate air pollution and mortality. *The New England journal of Medicine*, 350: 198–199.
- Krishnamurti G.S.R., Naidu R. (2003).** Solid–solution equilibria of cadmium in soils. *Geoderma*, 113: 17– 30.
- Kroppenstedt RM (1985).** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow M, Minnikin DE (eds). *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic, London, pp 173–199
- Kuhn A., Ballach H. J., Wittig R., (1998).** Seasonal variation of the distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in poplar leaves. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7, 164–169.
- Kuik P., Wolterbeek H.Th. (1995).** Factor analysis of atmospheric trace-element deposition data in The Netherlands obtained by moss monitoring. *Water, Air and Soil Pollution*, 84: 323–346.
- Kuo C.Y., Cheng Y.W., Chen Y.W., Lee H. (1998).** Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan. *Environmental Research Sec A* 78:43–49.
- Kuperman R.G., Carreiro M.M. (1997).** Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and biochemistry* 29, 179–190.
- Mukhortova L. V. e Evgrafova S. Yu.. (2005).** Dynamics of Organic Matter Decomposition and Microflora Composition of Forest Litter in Artificial Biogeocenoses. *Biology Bulletin*, Vol. 32, No. 6, 2005, pp. 609–614.
- Läkanen, E., Erviö, R. (1971).** A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agralia Fennica* 123, 223-232
- Lambers H. (1987).** In *Root Development and Function*. Gregory P.J., Lake J.V., Rose D. Eds., Cambridge University Press, Cambridge, pp 125-146.
- Lambers H. (1998).** *Plant PHysiological Ecology*, Springer, New York.
- Lambert M., Kremer S., Sterner O., Anke B. (1994).** Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3597–3601.
- Lange B., Kremer S., Sterner O., Anke H. (1994).** Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenesulfate in strain JK 364. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3602–3607
- Langenhoff A., Zehnder A., Schraa G. (1996).** Behavior of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment column. *Biodegradation*, 7: 267–274.
- Larson W. E., Pierce F. J. (1994).** The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. p. 37-51. In: Doran, J.W. et al. (Ed.). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America Special Publication No. 35. Madison, WI
- Larson W.E., Pierce F.J. (1991).** Conservation and enhancement of soil quality. In: Dumanski, J. (Ed.), *Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World*. Proceedings of the International Workshop, Chiang Rai,

Thailand, 15– 21 Sept. 1991. Technical papers, vol. 2. Int. Board for Soil Res. and Management, Bangkok, Thailand, pp. 175– 203.

Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems. *Earth Science Reviews* 51:1–31.

Lee I-S, Kimo. K., Chang Y.Y., Baeb B., Kim H. H., Baek K. H. (2002). Heavy Metal Concentrations and Enzyme Activities in Soil from a Contaminated Korean Shooting Range. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94:406-411

Lehndorff E., Schwark L. (2004). Biomonitoring of air quality in the Cologne Conurbation using pine needles as a passive sampler—Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment*, 38: 3793–3808.

Leirós, M.C., Trasar-Cepeda C., García-Fernández F., Gil-Sotres F. (1999). Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 30, 140–146.

Leita L., De Nobili M., Muhlbachova G., Mondini C., Marchiol L., Zerbi G. (1995). Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology and Fertility Soils*, 19: 103–108.

Levitt J., (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York.

Li H.F., Gray C., Micò C., Zhao F.J., McGrath S.P. (2009). Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils. *Chemosphere*, 75: 979–986.

Lin T.C., Chang F.H., Hsieh J.H., Chao H.R., Chao M.R. (2002). Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulate in indoor and outdoor atmosphere of a Taiwanese temple. *Journal of Hazardous Material A* 95:1–12.

Lindahl V. (1996). Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 279-286.

Lindberg S.E., Lovett G.M., Meiwes K.J. (1987). Deposition and forest canopy interactions of airborne nitrate. In: Hutchinson, T.C., Meema, K.M. (Eds.), *Effects of Atmospheric Pollutants on Forests, Wetlands and Agricultural Ecosystems*. Springer, Berlin, pp. 117-130.

Lindsay, W.L., Norvell, W.A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 421-428.

Lipman C. B., Burgess P. S. (1914). The effects of copper, zinc, iron and lead salts on ammonification and nitrification in soils. *University of California Publications in Agricultural Science*, 1: 127-139.

Lodovici M., Akpan V., Casalini C., Zappa C., Dolara P. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a measure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany. *Chemosphere*, 36: 1703–1712.

Loppi S., Bonini I., (2000). Lichens and mosses as biomonitors of trace elements in areas with thermal springs and fumarole activity (Mt. Amiata, central Italy). *Chemosphere*, 41: 1333–1336.

Loppi S., Pirintsos S.A. (2003). Epiphytic lichens as sentinels for heavy metal pollution at forest ecosystems (central Italy). *Environmental Pollution*, 121:327–332

Loreau M. (2001). Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: A theoretical model. *Prpceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268,303-309

Lukina N.V., Nikonov, V.V. (1998). Nutrient Regime of Northern Taiga Forests: Natural and Technogenic Aspects. *Apatity*.

Lundgren B. (1981). Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos*, 36:17-22.

Mabey W.R., Smith J.H., Podoll R.T., Johnson H.L., Mill T., Chou T.W., Gates J., Partridge I.W., Jaber H., Vandenbergh D. (1982). Aquatic fate processes for organic priority pollutants. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC

- Madejón E., Burgos P., López R., Cabrera F. (2001).** Soil enzymatic response to addition of heavy metals with organic residues. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 144–150.
- Magee B.R., Lion L.W., Lemley A.T. (1991).** Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media. *Environmental Science and Technology*, 25:323–331
- Maisto G., Alfani A., Baldantoni D., De Marco A., Virzo De Santo A. (2004).** Trace metals in the soil and in *Quercus ilex* L. leaves at anthropic and remote sites of the Campania Region of Italy. *Geoderma*, 122: 269-279.
- Maisto G., De Nicola F., Iovieno P., Prati M.V., Alfani A.(2006).** PAHs and trace elements in volcanic urban and natural soils *Geoderma*, 136:20–27
- Maliszewska-Kordybach B.(1999).** Persistent Organic Contaminants in the Environment: PAHs as a Case Study', in J. C. Block, V. V. Goncharuk and Ph. Baveye (eds), *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 3–34.
- Manes F., Astorino G., Vitale M., Loreto F. (1997).** Morpho- functional characteristics of *Quercus ilex* L. leaves of different age and their ecophysiological behaviour during different seasons. *Plant Biosystems*. 131, 149–158.
- Manzo S., De Nicola F., De Luca Picione F., Maisto G., Alfani A. (2008).** Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere*, 71: 1937-1944.
- Margaris N.S., (1981).** Adaptative strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: di Castri, F., Goodall, D.W., Specht, R.L. (Eds.), *Mediterranean-type Shrublands. Ecosystem of the World 11*. Elsevier, Amsterdam, pp. 309–315.
- Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. (2000).** Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40:339-346
- Marschner P., Crowley D., Yang C.H. (2004).** Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil*, 261: 199–208
- Martinez-Salgado M.M., Gutiérrez-Romero V., Jannsens, M., Ortega-Blu R. (2010).** Biological soil quality indicators: a review. In: A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 319-328
- Mayer A.M., Harel E., (1979).** Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193–215.
- McLachlan M. S., (1996).** Bioaccumulation of Hydrophobic Chemicals in Agricultural Feed Chains. *Environmental Science and Technology*, 30, 252–259.
- McLachlan M.S. (1999).** Framework for the interpretation of measurements of SOC in plants. *Environmental Science and Technology*, 33: 1799-1804
- Medzon E. L., Brady M. L. (1969).** Direct measurement of acetylcholinesterase in living protist cells. *Journal of Bacteriology*, 97:402-415.
- Meikle A., Amin-Hanjani S., Glover L.A., Killham K., Prosser J.I. (1995).** Matric potential and the survival and activity of a *Pseudomonas fluorescens* inoculum in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 881-892.
- Menichini E., Monfredini F., Merli F.. (1999).** The temporal variability of the profile of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome, 1993-1998. *Atmospheric Environment*, 33:3739-3750.
- Menichini, E. (1992).** Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Science of the Total Environment*, 116, 109–135.
- Merian E. (Ed). (1991).** Metals and their compounds in the environment: Occurrence, Analysis and biological relevance. VCH, Weinheim, Germany, 1438 pp.

- Mikanova O. (2006).** Effects of heavy metals on some soil biological parameters. *Journal of Geochemical Exploration*, 88: 220–223
- Monaci F., Moni F., Lanciotti E., Grechi D., Bargagli R. (2000).** Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead *Environmental Pollution*, 107: 321-327.
- Miller R.M., Lodge D.J. (1997).** Fungal responses to disturbance: Agriculture and forestry. In: *The Mycota IV. Environmental and microbial Relationship*. Wicklow/Soderstrom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 65-79.
- Mortensen U., B. Norin e Wadso I. (1973).** Microcalorimetry in the study of the activity of microorganisms. *Bull. Ecol. Res. Comm. (NFR Statens Naturvetensk.Forskningsrad)* 17:189-197.
- Myrold D.D., Nason, G.E. (1992).** Effect of acid rain on soil microbial process. In: *Environmental Microbiology* (Mitchell, R., Ed), pp.59-82. Wiley- Liss, New York.
- Nannipieri P. (1984).** Microbial biomass and activity in soil, ecological significance. In: Klug MJ, Redy CA (eds) *Current prospectives in microbial ecology*. America Society of Microbiology, Washington DC, pp 515-521
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi G., Pietramellara G., Renella G.(2003).** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655–670
- Nannipieri P., Badalucco L., Landi L. (1994).** Holistic approaches to study of populations, nutrient pools and fluxes: limits and future research needs. In: *Beyond the Biomass: Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities* (eds K. Ritz, J. Dighton & K.E. Giller), pp. 231–238. John Wiley & Sons, Chichester.
- Nannipieri P., Sequi P., Fusi, P., (1996).** Humus and enzyme activity, in: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, pp. 293–328.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. (2002).** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (eds R.G. Burns & R. Dick), pp. 1–33. Marcel Dekker, New York.
- Nardi S. (2000).** Sintesi e trasformazione della sostanza organica del profilo del suolo. In: Sanesi G. *Elementi di pedologia. I suoli, loro proprietà, gestione e relazioni con l'ambiente*. Calderioni edagricole. Capitolo 5.
- National Research Council (1994).** Soil and watre quality: an agenda for agriculture. The National Academic Press, Washington, DC
- Ndiaye E.L., Sandeno J.M., McGrath D., Dick, R.P. (2000).** Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*, 15: 26–36.
- Neff J.M. (1979).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers, London.
- Neff, J.M., (1978).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment and cancer risk to aquatic organisms and man. In: *Symposium: Carcinogenic Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment*, pp. 385–409.
- Neinhuis C., Barthlott W. (1997).** Characterisation and distribution of waterrepellent, self cleaning plant surface. *Annals of Botany*, 79: 667-677.
- Newell S.Y., Miller J.D., Fallon R.D. (1987).** Ergosterol content of saltmarsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. *Mycologia*, 79: 688–695.
- Nguyen C. (2003).** Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23: 375–396.
- Nielsen N.M., Winding A., Binnerup S., Hansen B.M., Kroer N.(2002).** Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute (NERI). Technical Report No. 388.
- Nies DH. (1999).** Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:730–50.
- Nikonov, V.V., Koptsik G.N. (1999).** Acid Rains and Forest Soils. Apatity.

- Nilsson L.O., Bååth E., Falkengren-Grerup U., Wallander H. (2007).** Growth of ectomycorrhizal mycelia and composition of soil microbial communities in oak forest soils along a nitrogen deposition gradient. *Oecologia*, 153: 375–384.
- Ohtonen R. (1994).** Accumulation of organic matter along a pollution gradient: application of Odum's theory of ecosystem energetics: *Microbial Ecology*, 27: 43-55
- Olazábal C. (2003).** Orientamenti dell'Unione Europea in materia di siti contaminati. In: Atti del Convegno "Bonifiche dei siti contaminati in Europa. Protezione della salute umana e dell'ambiente a confronto con i problemi socio-economici."
- Orecchio S., (2007).** PAHs associated with the leaves of *Quercus ilex* L.: extraction, GC-MS analysis, distribution and sources assessment of air quality in the Palermo (Italy) area. *Atmos Environ* 41 : 8669-8680
- Ötvösa E., Kozáka I.O., Feketea J., Sharma V.K., Tubac Z. (2004).** Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum cupressiforme*) in Hungary. *Science of the Total Environment*, 330:89–99
- Pan B., Xing B.S., Liu W.X., Tao S., Lin X.M., Zhang X.M., Zhang Y.X., Xiao Y., Dai H.C. e Yuan H.S. (2006).** Distribution of sorbed phenanthrene and pyrene in different humic fractions of soils and importance of humin. *Environmental Pollution*, 143: 24-33.
- Pankhurst C. E., Ophel-Keller K., Doube B. M., Gupta V. V. S. R. (1996).** Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation*, 5: 197-209.
- Pankhurst C. E., Rogers S. L., Gupta V. S. R. (1998).** Microbial Parameters for Monitoring Soil Pollution. In J. M. Lynch and A. Wiseman (eds), *Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 46–68
- Park S.S., Kim Y.J., Kang C.H. (2002).** Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment*, 36: 2917–2924.
- Park S.S., Kim Y.J., Kang C.H. (2002).** Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment*, 36:2917–2924.
- Paul E., Clark F.E. (1989).** Soil biology and biochemistry. Academic Press, San Diego
- Peijnenburg W., de Groot A., Jager T., Posthuma L., (2005).** Short-term ecological risks of depositing contaminated sediment on arable soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 1-14.
- Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Eijssackers H.J.P., Allen H.E. (1997).** Conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37:163– 172.
- Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, Bååth E (1996).** Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl Environ Microbiol* 62:420–428
- Pennanen T., Perkiömäki J., Kiikkilä O., Vanhala P., Neuvonen S., Fritze H. (1998).** Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 291-300.
- Pereira K. C. D. Evangelista H., Pereira E. B., Simões J.C., Johnson E., Melo L. R. (2004).** Transport of crustal microparticles from Chilean Patagonia to the Antarctic Peninsula by SEM-EDS analysis *Tellus*, 56B, 262–275
- Perera, F., Hemminki, K., Jedrychowski, W., Whyatt, R., Campbell, U., Hsu, Y., Santella, R., Albertini, R., O'Neill, J.P., (2002).** In utero DNA damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in newborns. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11, 1134–1137
- Periasamy M., Vivekananda Bhatt M. (1978).** Facile oxidation of aromatic rings by $Mn_2(SO_4)_3$. *Tetrahedron Letters*, 46: 4561–4562

- Perucci P. (1992).** Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biol Fertility of Soils*, 14:54–60
- Pichtel J., Kuroiwa K., Sawyerr H.T. (2000).** Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution*, 110: 171–178.
- Pierce F.J., Larson W.E., Dowdy R.H. (1984).** Soil loss tolerance: maintenance of long-term soil productivity. *Journal of Soil and Water Conservation*, 39, 136–138.
- Pignatello J.J. (1998).** Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76-77: 445-467
- Poikolainen J. (1997).** Sulfur and Heavy Metal Concentrations in Scots Pine Bark in Northern Finland and the Kola Peninsula. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography*, 93:395–408.
- Pope III. C.A., Thun M.J., Namboodiri M., Dockery D.W., Evans J.S., Speizer F.E., Heath Jr. C.W. (1995).** Particulate air pollution is a predictor of mortality in a prospective study of US adults. *American Journal of respiratory and Critical care Medicine*, 151: 669–674
- Powlson D.S., Jenkinson D.S. (1976).** The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. II. Gamma irradiation, autoclaving, air-drying and fumigation. *Soil Biology & Biochemistry*, 8: 179–188.
- Prosser J. I. (2002).** Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 244: 9–17.
- Providenti, M.A., Lee, H., Trevors, J.T., (1993).** Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 379–395.
- Provini A., Galassi S., marchetti R. (2003).** *Ecologia applicata*. Città studi edizioni.
- Prussia C.M.,Killingbeck K.T. (1991).** Concentrations of ten elements in two common foliose lichens: leachability, seasonality, and the influence of the rock and tree bark substrates. *The Bryologist*, 94: 135–142.
- Rambal, S., (1992).** *Quercus ilex* facing water stress: a functional equilibrium hypothesis. *Vegetatio*, 99-100, 147–153.
- Ramsay A. J., Bawden A. D. (1983).** Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biology and Biochemistry*, 15: 263-268.
- Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP, Gordon NS, Moore JN, Holben WE, Gannon JE (2005).** Relationship between communities and processes; new insights from a field study of a contaminated ecosystem. *Ecol Lett* 8:1201–1210
- Rauret G. (1998).** Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46: 449–455.
- Rauret G., Llaurodo´ M., Tent J., Rigol A., Alegre L.H., Utrillas M.J. (1994).** Deposition on holm oak leaf surface of accidentally released radionuclides. *Science of the Total Environment*, 157: 7–16.
- Rautio P., Huttunen S., Lamppu J.(1998).** Effects of Sulfurand Heavy Metal Deposition on Foliar Chemistry of Scots Pines in Finnish Lapland and on the Kola Peninsula. *Chemosphere*, 36: 979–984.
- Reganold J. P., Palmer A. S. (1995).** Significance of gravimetric versus volumetric measurements of soil quality under biodynamic, conventional, and continuous grass management. *Journal of Soil and Water Conservation*, 50: 298-305.
- Rice ChW, Moorman T.B, Beare M (1996).** Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: Doran JW, Jones AJ (eds) *Methods for assessing soil quality*, vol. 49. Madison, WI: SSSA Special Public, pp 203–215
- Riepert F., Wilke B. M. (1999).** *Soil Quality – Guidance on the Ecotoxicological Characterization of Soils and Soil Materials*. Document ISO/15799
- Riis V., Lorbeer H., Babel W. (1997).** Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 1573–1581.

- Romandini P., Tallandini L., Beltramini M., Salvato B., Manzano M. (1992).** Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103C: 255-262.
- Rooney C.P., Zhao F.J., McGrath S.P. (2006).** Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 726–732.
- Roselló-Mora R., Amann R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Archive of Microbiological Reviews*, 25:39-67.
- Rossini S. O., Mingorance M.D. (2006).** Assessment of airborne heavy metal pollution by aboveground plant parts. *Chemosphere*, 65:177–182
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. (2010).** The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 516–520.
- Rutigliano F.A., Alfani A., Bartoli G., Fierro A.R., Castaldi S., Cotrufo M.F., et al. (1993).** Carico di metalli pesanti e attività enzimatica in suoli dell'area urbana di Napoli. *Studi sassaresi*, XXXV (2°), 451-460.
- Rutigliano F.A., D'Ascoli R., Virzo De Santo A. (2004).** Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1719–1729
- Sabate´ S., Sala A., Gracia C.A., (1999).** Leaf traits and canopy organisation. In: Roda`, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot, J. (Eds.), *Ecology of Mediterranean Evergreen Oak Forests*. Ecological Studies, vol. 137. Springer, Berlin, pp. 121–133
- Samet J.M., Dominici F., Curriero F.C., Coursac I., Zeger S.L. (2000).** Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987–1994. *The New England journal of Medicine*, 343: 1742–1749.
- Sánchez-Monedero M. A., Mondini C., Cayuela M. L., Roig A., Contin M., De Nobili M. (2008).** Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biol Fertility of Soils*, 44:885–890
- Santasiero A., Settimo G., Cappiello G., Viviano G., Dell'Andrea E., Gentilini L. (2005).** Urban crematoria pollution related to the management of the deceased. *Microchemical Journal*, 79:307–317.
- Śašek V., Glaser J.A., Baveye Ph. (2003).** The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solution. *Nato Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schauer C., Niessner R., Pöschl U. (2003).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. *Environmental Science and Technology*, 37, 2861–2868
- Schlöter M., Dilly O., Munch J.C. (2003).** Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 255–262
- Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., Warshawsky D. (1996).** Degradation of pyrene, benzo[a]anthracene, and 62 benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJG 11-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 13–19.
- Schnürer J., Rosswall T. (1982).** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 6: 1256–1261.
- Schultze E.D., Mooney H.A. (Eds.) (1993).** *Biodiversity and Ecosystem Function*. Springer, Berlin
- Schwartz J. (2000).** Harvesting and long-term exposure effects in the relation between air pollution and mortality. *American Journal of Medicine*, 151: 440–448.
- Sextone A.J., Everett K., Jenkins T., Atlas R. (1978).** Fate of crude and refined oils in north slope soils. *Arctic*, 31: 339- 347.

- Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopa A. (2005).** Microbial catabolic diversity in soils contaminated with hydrocarbons and heavy metals. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 1974-1979
- Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membrane. *J Biol Chem* 1994;269:8022–8.
- Simko P., Khunova V. , Simon P., Hrubá M. (1995).** *International Journal of Food Science and Technology*, 30:807
- Simonich S.L., Hites R.A. (1994).** Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 28: 939-943
- Simonich S.L., Hites R.A., (1995).** Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29: 2905–2914.
- Sitaula B. K., Sitaula J. I. B., Aakra Å., Bakken L. R. (2001).** Nitrification and methane oxidation in forest soil: acid deposition, nitrogen input and plant effects. *Water, Air and Soil Pollution*, 130: 1061-1066. Printed in the Netherlands
- Skujins J., Nohrstedt H. O., Oden S. (1986).** Development of a sensitive biological method for the determination of a low level toxic contamination in soils. *Swedish Journal of Agricultural Research* 16:113–118.
- Slanina J., Möls J.J., Baard J.H. (1990).** The influence of outliers on results of wet deposition measurements as a function of measurement strategy. *Atmospheric Environment*, 24A: 1843–1860
- Sloof J.E. (1993).** *Environmental Lichenology: Biomonitoring Trace Element Air Pollution*. Thesis, University Technology Delft, The Netherlands.
- Smith W.H. (1981).** *Air Pollution and Forests*. Springer, New York.
- Tao, Z., Hornbuckle, K.C., 2001.** Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by broad leaves: analysis of kinetic limitations. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 1, 275-283.
- Soclo H.H., Garrigues P., Ewald M. (2000).** Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 387-396.
- Söderström, B. E. (1977).** Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 9:59-63.
- Song H.G., Bartha R. (1990).** Effects of jet fuel on the microbial community of soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 646-651.
- Sparling G. P. (1985).** The soil biomass. In: Vaughan D. and Malcolm R. E. (eds) *Soil organic matter and biological activity*. Nijhoff/Junk, Dordrecht, The Netherlands.
- Srogi K. (2007).** Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5:169–195
- Standard Reference Material 1515 Apple Leaves; NIST (1991).** National Institute of Standards & Technology.
- Steinnes E., Rambaek J.P., Hanssen J.E. (1992).** Large scale multi- element survey of atmospheric deposition using naturally growing moss as biomonitor. *Chemosphere*, 25: 735-752.
- Stockdale E.A., Brookes P.C., (2006).** Detection and quantification of the soil microbial biomass impacts on the management of agricultural soils. *Journal of Agricultural Science*, 144: 285–302.
- Stulen I., Perez-Soba M., De Kok L.J., Van der Eerden L. (1998).** Impact of gaseous nitrogen deposition on plant functioning. *New Phytologist*, 139: 61-70.
- Su Y.H., Yang X.Y. (2009).** Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil. *Science of The Total Environment*, 407: 1027-1034.
- Sunda W. G., Engel D. W., Thuotte R. M. (1978).** Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp. *Environmental Science and Technology*, 12:409-413.

- Sutherland J.B., Raffi F., Khan A.A., Cerniglia C.E. (1995).** Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals* (Young LY & Cerniglia CE, ed), pp 269–306. Wiley- Liss, New York.
- Suthersan SS. (1999).** In situ bioremediation. *Remediation engineering: design concepts*. Boca Raton: CRC Press
- Sverdrup G.M., Chuang J.C., Slivon L., McFarland A.R., Cooper A.R., Garber R.W., Smith B.S. (1991).** Comparison of chemical composition of fly ash particles collected in the plume and stack of a coal-fired power plant. In: *Proc. Intern. Conf. Managing Hazardous Air Pollutants: State of the Art*, Washington DC, November (quoted from Sloof, 1993).
- Szczepaniak K., Astel A., Bode P., Sârbu C., Biziuk M., Raińska E., Gos K. (2006).** Assessment of atmospheric inorganic pollution in the urban region of Gdańsk, Northern Poland. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 270, No.1:35–42
- Tack F.M.G., Verloo M.G. (1995).** Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 59: 225– 238.
- Terradas J., Save´ R., (1992).** The influence of summer and winter stress and water relation ship on the distribution of *Quercus ilex* L. *Vegetatio* 99-100, 137–145.
- Thoreau H.D. (2005).** L’ambiente terrestre. In: Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A (2005). *Microbiologia*. Zanichelli. Cap.42
- Tisdall J.M., Oades J.M. (1982).** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of soil science*, 33:141-163.
- Torslov J. (1993).** Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, dehydrogenase activity and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25: 33-40.
- Torstensson L. (1997).** Microbial Assays in Soil. in J. Tarradellas, G. Bitton, and D. Rossel (eds), *Soil Ecotoxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Tokyo, pp. 207–233.
- Torsvik V. e Goksøyr J., Daae F.L. (1990).** High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56:782-787.
- Torsvik V., e Øvreås L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5:240–245.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F. L., Sorheim R., michalsen J, Salte K. (1994).** Use of DNA analysis to determine the diversity of soil communities. In *Beyond the biomass. Compositional and functional analysis of soil microbial communities* (Ritz k., Dighton J., Giller K. E., eds), pp 39-48. Wiley, Chichester.
- Toth L., Blaas W. (1972)** *Fleischwirtsch.* 52:1419.
- Trapido M. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environmental Pollution*, 105: 67–74.
- Tremolada P., Burnett V., Calamari D., Jones K.C. (1996).** Spatial distribution of PAHs in the U.K. atmosphere. *Environmental and Science Technology*, 30: 3570–3577.
- Tremper A. H., Agneta M., Burton S., David E.B. Higgs (2004).** Field and Laboratory Exposures of Two Moss Species to Low Level Metal Pollution *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49: 111–120, 2004.
- Trevors J.T. (1998).** Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution*, 101: 45-67.
- Tsai P.-J., Shih T.-S., Chen H.-L., Lee W.-J., Lai C.-H., Liou S.-H. (2004).** Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers, *Atmospheric Environment*, 38: 333–343.

- Tunlid A., White D. C. (1992).** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil, p. 229-262. In G. Stotzky and J.-M. Bollag (ed.), *Soil biochemistry*, vol. 7. Marcel Dekker, New York
- Turner B.L., Hopkins D. W., Haygarth P.M., Ostle N.(2002).** Short communication B-Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20:157–162
- Tyler G. (1975).** Effect of heavy metal pollution on decomposition and mineralization rates in forest soil. In *Heavy Metals in the Environment*, eds. T. C. Hutchinson, A. L. Page and J. C. Loon, pp. 217-226. Toronto, Canada.
- UN-ECE(1998)** (United Nations Economic Commission for Europe)
Protocol to the Convention on long-range transboundary air pollution on persistent organic pollutants (POPs). Aarhus, Denmark, June 1998.
- Vallee B., Ulmer D. (1972).** Biological effects of mercury, cadmium and lead. *Annual Review of Biochemistry*, 49:91–128.
- Van Duijvenbooden W. (1992).** December. Monitoring. In: *Symposium Atmospheric Deposition and Soil Quality*. Ede, NL
- Van Elsas J.D., Jansson J.K, Trevors J.T. (2006).** *Modern soil microbiology* second edition. CRC press Boca raton,London New York.
- van Veen J.A., Heijnen C.E. (1994).** The fate and activity of micro-organisms introduced into soil. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO Australia, Adelaide, pp. 63-71
- Vance E.D, Brookes P.C, Jenkinson D.S. (1987).** An extraction method for measuring soil microbial C. *Soil biology and Biochemistry*, 19:703-707
- Vekemans X, Godden B, Penninckx M.J. (1989).** Factor analysis of the relationships between several physico-chemical and microbiological characteristics of some Belgian agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:53–58
- Vighi M., Bacci E. (1998).** *Ecotossicologia*. UTET
- Vingiani S., Adamo P., Giordano S. (2004).** Sulphur, nitrogen and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental Pollution*, 129: 145-158.
- Violante P. (2002).** *Chimica del suolo e della nutrizione delle piante*. Edagricole.
- Viskari E.L., Rekila R., Roy S., Lehto O., Ruuskanen J., Karenlampi L. (1997).** Airborne pollutants along a roadside: assessment using snow analyses and moss bags. *Environmental Pollution*, 97: 153-160.
- Wagner M., Amman R., Lemmer H., Schleifer K.-H. (1993).** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describe microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1520-1525.
- Walker B., (1992).** Biodiversity and ecological redundancy, *Conservation Biology*, 6:18-23
- Wang T.S.C., Huang P.M., Chou C-H & Chen J-H (1986).** The role of soil minerals in the abiotic polymerization of phenolic compounds and formation of humic substances. In: Huang PM & Schnitzer M (Eds) *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*. Special Publication No. 17 (pp 251–281).Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin
- Wang X.L., Tao S., Dawson R.W., Xu F.L. (2002).** Characterizing and comparing risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Tianjin wastewater-irrigated area. *Environmental Research*, 90:201–206
- Wang Y. P., Shi JY., Wang H., Lin Q., Chen X.C., Chen Y.X. (2007).** The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 75–81

- Wardle D. A., Giller K.E. (1996).** The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biology and biochemistry*, 28:1549-1554
- Warkentin B.P., Fletcher H.F. (1977).** Soil quality for intensive agriculture. Intensive Agriculture Society of Science, Soil and Manure. Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertilizer Management. National Institute of Agricultural Science, Tokyo, pp. 594– 598
- Webster. (1976).** 3rd New International Dictionary, Merriam, Chicago
- Weete A.D. (1989).** Structure and function of sterols in fungi. *Advance in Lipid Research*, 23: 115–167.
- Wegener J.W.M., van Schaik M.J.M., Aiking H. (1992).** Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environmental Pollution*, 76: 15-18.
- Welsch-Pausch K., McLachlan M.S., Umlauf G., (1995).** Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to *Lolium multiflorum* (Welsh Ray Grass). *Environmental Science and Technology*, 29: 1090-1098
- Wenzl T., Simon R., Kleiner J., Anklam E. (2006).** Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 7
- Wetzel A. (1998).** Advances in Biomonitoring: Sensitivity and Reliability in PAH-contaminated Soil. In J. M. Lynch and A. Wiseman (eds), *Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 27–45.
- Wierzbicka M. (1987).** Lead accumulation and its trans location barriers in roots of *Allium cepa* L.-autoradiographic and ultrastructural studies. *Plant Cell Environment* 10, 17-26
- Wild S.R., Obbard J.P., Munn C.I., Berrow M.L., Jones K.C. (1991).** The long-term persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludges. *Science of the Total Environment*, 101:235– 53.
- Wild S. R., Jones K. C.(1995).** Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget, *Environmental Pollution*, 88: 91–108.
- Wild S.R., Berrow M.L., McGrath S.P., Jones K.C.(1992).** Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. *Environmental Pollution*, 76: 25–32.
- Wilk M., Bez W., Rochlitz J. (1966).** Neue Reaktionen der carcinogenen Kohlenwasserstoffe 3,4-Benzpyren, 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen und 20-Methylcholanthren. *Tetrahedron*, 22: 2599–2608
- Wilkinson S.C., Anderson J.M., Scardelis S. P., Tsiafouli M., Taylor A., Wolters V. (2002).** PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litter subject to moisture stress. *Soil Biology and biochemistry*, 34:189-200
- Willison JC, (2004).** Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *FEMS Microbiol Lett* 241: 143–150.
- Wolt J. (1994).** *Soil Solution Chemistry*. John Wiley, New York.
- Wolterbeek B. (2002).** Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution*, 120:11–21
- Wolterbeek H.Th., Freitas M.C. (1999).** Preface. *Science of the Total Environment* 232, 1–2.
- Wolters V. (1991).** Biological processes in two beech forest soils treated with simulated acid rain – a laboratory experiment with *Istoma tigrina* (Insecta, Collembola). *Soil biology and Biochemistry*, 23: 381-390

- Wu J., Joergensen R.G., Pommerening B., Chaussod R. e Brookes P.C. (1990).** Measurement of soil microbial biomass C – an automated procedure. *Soil biology and Biochemistry* 22: 1167-1169
- Xiang L.Gan Z., Kevin C. J., Xiangdong L., Xianzhi P., Shihua Q. (2005).** Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum plumaeformae* WILS.) from the northern slope of Nanling Mountains, South China
Atmospheric Environment, 39:5490–5499
- Xu S.S., Liu W.X., Tao S.(2006).** Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China. *Environmental Science and Technology*, 40: 702–708.
- Yang H.H., Lai S.O., Hsieh L.T., Hsueh H.J., Chi T.W. (2002).** Profiles of PAH emission from steel and iron industries. *Chemosphere*, 48:1061–1074
- Yang H-H., Lee W-J., Chen S-J, Lai S.-O (1998).** PAH emission from various industrial stacks *Journal of Hazardous Materials*, 60:159–174
- Yu-F. J., Xue-Tong W., Fei W., Ying J., Ming-Hong W., Guo-Ying S., Jia-Mo F. (2009).** Levels, composition profiles and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soil of Shanghai, China *Chemosphere*, 75:1112–1118
- Yunker M.B., MacDonald R.W., Vingarzan R., Mitchell R.H., Goyette D., Sylvestre S. (2002).** PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33:489-515
- Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. (1994).** Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1101-1108.
- Zhao X.R., Lin Q., BrookesP.C. (2005).** Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology & Biochemistry*, 37:311–317.
- Zimcka J.R., Stackurski A. (1994).** Intensity of retranslocation of macro and microelements from ageing foliage of deciduous forest vegetation. *Ekol. Polska*, 40: 333–351.

